Aus der WE 1 – Institut für Anatomie
der Freien Universität Berlin

MYOGENESE IN EINEM ORGANKULTURSYSTEM VON EXTREMITÄTENKNOSPEN 11 TAGE ALTER MÄUSEEMBRYONEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Claus Reinhard Baumgarten
aus Stassfurt

1975

Aus der WE 1 – Institut für Anatomie
der Freien Universität Berlin

MYOGENESE IN EINEM ORGANKULTURSYSTEM VON EXTREMITÄTENKNOSPEN 11 TAGE ALTER MÄUSEEMBRYONEN

DMV
LIBRARY
1985

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Claus Reinhard Baumgarten
aus Stassfurt

Referent : Professor Dr. med. H.- J. Merker
Korreferent : Professor Dr. med. K. Toepfer

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 5. September 1975

Druck: Zentrale Universitätsdruckerei, V a A 4

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	5
Material und Methoden	13
Befunde	15
Diskussion	24
Zusammenfassung	3o
Bildmaterial	32
Literatur	55

Einleitung

Die morphologischen Vorgänge während der Myogenese in vivo sind in zahlreichen Arbeiten der letzten Zeit, die die Ergebnisse verschiedener Methoden berücksichtigen, beschrieben worden. Die dabei immer wieder aufgetretenen Fragen konnten zu einem großen Teil zufriedenstellend beantwortet werden, so daß heute ein zusammenhängendes und glaubwürdiges Modell der Muskelentwicklung zur Verfügung steht.

1. Die Mehrkernigkeit wird mit der Multizellulartheorie erklärt. Die Muskelfasern entstehen durch Verschmelzung vieler Myoblasten (Caspers, 1960). Die sogenannte Myotubenbildung (= Muskelfaserbildung) kann deshalb durch DNA- Synthesehemmung nicht unterbunden werden (Konigsberg et al., 1960). Elektronenmikroskopische Bilder der verschiedenen Stadien der Fusion (Hay, 1963; Shimada, 1971), "close contacts", Verzahnung und Zellmembranauflösung mit Vesikelbildung unterstützen diese Theorie (Hay, 1963; Shimada, 1972; Konigsberg und Lipton, 1972). Dabei tritt ein buntes morphologisches Erscheinungsbild auf, das wahrscheinlich aus dem unterschiedlichen Grad der Fusion und dem verschiedenen Alter der muskelformenden Zellen resultiert (Lit. siehe auch Schüssler, 1971).

2. Die Myofilamentbildung als charakteristisches Merkmal der Myogenese erfolgt an den Ribosomen, die zu langen Polysomenketten spiralförmig angeordnet sind (Breuer et al., 1964). Es bestehen enge Verknüpfungen zwischen Polysomenzahl und Rate der Akto- Myosinsynthese (Shimada et al., 1967).
Elektronenmikroskopisch werden in allen Arbeiten drei Filamentarten unterschieden:
Myosin- oder dicke Filamente mit einem Durchmesser von

15o- 17o A, dünne oder Aktin- Filamente mit 6o- 9o A Durchmesser und 1oo A- Filamente, wahrscheinlich Tropomyosin- , deren funktionelle Bedeutung noch nicht eindeutig geklärt ist (Ishikawa, 1968; Schüssler, 1971).

3. Über die Aggregation der Filamente zu Fibrillen zuerst dicht unter dem Sarkolemm, über ihre Ausrichtung in der Längsachse und über den allgemeinen Mechanismus der Bandmuster- Bildung ist sehr viel weniger bekannt. Huxley (1963) spricht von polarisierenden Filamenten, die sich kraft ihrer Polarisationsnatur ordnen. Andere Autoren sprechen den zahlreichen Mikrotubuli, die gehäuft parallel der Längsachse angetroffen werden, eine richtende Kraft zu. Die Ausrichtung der Filamente ginge also sekundär in einem durch die mechanischen Eigenschaften der Mikrotubuli vorgeprägtem Molekulargefüge vor sich (Porter, 1966).

4. Das sarkoplasmatische Retikulum (SR) und transversale tubuläre System (TS) findet man schon im frühesten Muskelfaseralter. Aus den anfangs wenigen und kurzen isolierten Cisternen des SR wachsen glattwandige Ausläufer in Richtung Z- Streifen. Zuerst bestehen keine Beziehungen zwischen Myofibrille, TS und SR, später kommt es aber dann zur Triadenbildung und enger Verbindung mit den Myofibrillen durch Verlängerung und Verzweigung des TS und SR (Ezerman und Ishikawa, 1967).
Die TS- Tubuli entstehen durch Invagination und wiederholte Vesikulationsprozesse des Sarkolemms (Ishikawa, 1967; Schüssler, 1971).

5. Die Existenz der Satelliten- Zellen wird heute allgemein anerkannt. Es handelt sich offenbar um Zellen, die als undifferenzierte, proliferationspotente Zellen über die frühe Stufe der Entwicklung fortbestehen. Diese kleinen abgeflachten "Myoblasten" haben einen dichten läng-

lichen Kern und einen schmalen elektronendichten Zytoplasmasaum (Mauro, 1961) und liegen unter der Basalmembran den Muskelfasern kappenartig auf. Sie sind offenbar in der Lage, immer Vorstufen der DNA zu inkorporieren und können sich deshalb bei Bedarf noch teilen (Enesco und Puddy, 1964). Im wachsenden Tier ist zu beobachten, daß die beiden dabei entstehenden Tochterkerne in die angrenzende Muskelfaser einverleibt werden. Sie sorgen für undifferenzierte Myoblasten bei der Regeneration des Skelettmuskels auch im Erwachsenenalter (Reznik, 1969; Church, 197o).

Bei der Untersuchung dieser Myogenese- Vorgänge, die aufgrund der vorliegenden morphologischen Ergebnisse formalmorphologisch gesichert sind, bleiben aber die treibenden und regulierenden Kräfte noch unbekannt. Hier ist besonders der Nerveneinfluß zu nennen (Muscatello et al., 1965; Faber und de Both, 197o; Schiaffino und Settembrini, 197o). Nach den bisher vorliegenden Publikationen ist wahrscheinlich eine nervöse Beeinflussung zur endgültigen Ausreifung des muskulären Systems notwendig. Aus allen bisher zitierten in vivo- Untersuchungen kann aber nicht entschieden werden, welche Entwicklungsstufe des Muskels allein durch genetische Vorprägung, welche durch funktionelle Beanspruchung und welche durch Nerven erreicht wird. Eine Antwort auf diese Fragen wäre in der Kultur wenigstens teilweise möglich.

Inzwischen sind eine Fülle von Kultivationsverfahren entwickelt worden, die vielleicht eine noch differenziertere Antwort dieser Fragen ermöglichen (Lit. siehe Merchant et al., 196o; Merker, 1975). Es muß dabei prinzipiell zwischen monolayer- Kulturen und Organkulturen unterschieden werden. Bei den monolayer- Kulturen handelt es sich um vollständig isolierte Zellen, die in dünner Schicht wachsen. Hier ist also sowohl der nervale Einfluß als

auch die dreidimensionale Anordnung, die gegenseitige Zellbeziehung im Verband, nicht erhalten und damit auch nicht die gegenseitigen räumlich- mechanischen und auch chemischen Beziehungen. Mit der ersten Kulturmethode lassen sich also wesentlich die allein genetisch bedingten Entwicklungen studieren, da die geweblichen Interaktionen, die funktionellen Beeinflussungen und die Nervenbeeinflussung wegfallen. Natürlich müssen bestimmte Milieuanforderungen - Unterlage, Medienzusammensetzung etc. - erfüllt sein. In der Organkultur ist sowohl die genetische Grundlage als auch der Gewebsverband erhalten. Nervale und funktionelle Beeinflussungen fallen dagegen weg. Bei einem Vergleich zwischen beiden Kulturmethoden müßten sich deshalb die Bedeutungen der hier geschilderten Faktoren genauer erfassen lassen.

Ober die Morphologie der Myogenese in monolayer- Kulturen liegen zahlreiche Arbeiten vor. Entsprechende Befunde von Organkulturen fehlen dagegen noch.
Alle Reifungs-, Differenzierungs- und Morphogenesevorgänge im in vitro- System verlaufen im Lichtmikroskop auffallend gleich den in vivo- Vorgängen. Es ist deshalb kaum verwunderlich, daß sie auch elektronenmikroskopisch sehr ähnlich sind.
Bei allen trypsinisierten und damit isolierten Zellen erfolgt in der monolayer- Kultur in den ersten Stunden lichtmikroskopisch eine räumliche Anordnung und die Kontaktaufnahme mit dem Substrat. Ebenfalls nach Stunden flachen sich die Zellen ab und beginnen sich zu verlängern. Vom ersten bis dritten Tag vermehren sich die Zellen, wandern und gewinnen Kontakt zueinander (Shimada et al., 1967). In dieser Zeit lassen sich elektronenmikroskopisch auch Myoblasten identifizieren, die kurz vor der sich zu unterziehenden Fusion stehen. Sie sind morphologisch gleich den in vivo beschriebenen; Myofilamente fehlen noch zu dieser Zeit (Holtzer et al., 1957; Shimada, 1971; Konigsberg und Lip-

ton, 1972). Mit dem dritten Tag beginnt die Fusion und Multinukleation, sodaß bereits in der ersten Woche lange Fasern (Myotuben), verzweigt und schon durch Querstreifung charakterisiert, entstehen. Konigsberg und Lipton (1972) meinen, daß die Oberflächenvergrößerungen (Fortsatzbildung und Vesikulationen) und die rau- faserigen Grenzmembranen zwischen zwei benachbarten Myoblasten sicher der erleichterten Fusion dienen, ob sie beweisend für die Prä- oder gar Fusion sind, ist zweifelhaft. In vitro können durch Fusion innerhalb von 24 Stunden bis zu 1oqo Kerne enthaltende Myotuben entstehen (Okazaki und Holtzer, 1965; Shimada et al., 1967). Dagegen dauert sie

in vivo Wochen. Außerdem ist die Kern- Plasma- Relation in vitro viel größer.
Die Fusion beginnt für die Einzelzelle fünf Stunden nach dem letzten Teilungszyklus in der G1- Phase, ist verkettet mit dem Teilungszyklus und findet nicht in S, G2, M oder frühen G1- Stunden statt. Danach, d.h. nach der Fusion, ziehen sich diese Myoblasten aus dem Mitosezyklus zurück (Bischoff und Holtzer, 1969).
Am sechsten Tag sind fast alle Zellgrenzen verschwunden. Um Artefakte auszuschließen, haben Lipton und Konigsberg (1972) bei der Untersuchung der Fusionsvorgänge die elektronenmikroskopische Kipptisch- Analyse angewendet und mit dieser Methode ebenfalls diese Vorgänge und Vorstellungen bestätigen können.

In dem in vitro sich entwickelnden Muskelsystem lassen sich vier Klassen von Zellen definieren:

1. Proliferierende myogene Stammzellen, die sich noch teilen und neue Stammzellen bilden können. Nach der letzten sogenannten "Critical division" verlassen sie den Mitosezyklus und werden
2. Myoblasten, welche fähig sind durch Fusion
3. Myotuben (Fasern) zu formen, die mit der Synthese

kontraktiler Proteine beginnen. Darüberhinaus kommen noch

4. nichtmuskuläre Zellen vor, welche extrazelluläre Bestandteile (Kollagen, Glykosaminglykane und Proteoglykane) zum "Histion"- Muskel beisteuern.

Die Reifung sowohl in vivo als auch in vitro ist abhängig bzw. verbunden mit dem Wechsel der Aktivität und der relativen Proportionen dieser Sub- Populationen (Holtzer und Bischoff, 1969).

Wahrscheinlich also sind Zellteilung und Skelettmuskeldifferentiation sich gegenseitig ausschließende Ereignisse (Shimada, 1971). Dagegen ist die Multinukleation nicht unbedingte Voraussetzung für die Myosin- und Aktinsynthese (Holtzer et al., 1957). Jedoch konnte in vivo wie in vitro gleichermaßen gezeigt werden, daß die überwiegende Mehrheit der Filamente erst in multinukleären Zellen gefunden wurde.
So werden ab vierten Tag der monolayer- Kultur freie Myofilamente in den Myotuben gesehen. In den darauffolgenden Tagen werden freie dünne Aktinfilamente (6o-9o A) und freie dicke Myosinfilamente (15o- 17o A) unterschieden, die noch nicht zu Myofibrillen aggregiert sind. Wie auch in vivo, ist die Zahl der freien Myofilamente umgekehrt proportional den in hexagonaler Form angeordneten Filamenten. Eine Verschiebung freier zu gebündelten Myofilamenten ist deshalb wahrscheinlich.
Am Ende der zweiten Woche haben die Myofibrillen in vitro das Zytoplasma vollständig ausgefüllt, die Kerne sind an den Rand der Muskelfasern gedrückt und mit Ausnahme der Verzweigungen der Fasern ähneln diese dem des erwachsenen Muskels in vivo; auch in der Anordnung der Mitochondrien und des Myofibrillen- Bandmusters (Shimada et al., 1967). Die gesamte Myosinproduktion in einer Muskelfaser ist in vitro (monolayer- Kultur) viel größer als in vivo (Okazaki und Holtzer, 1965).

Unerwartet ist auch die gute Entwicklung des SR und TS, obwohl keine nervalen Elemente in der Kultur vorhanden sind (Shimada et al., 1967; Ezerman und Ishikawa, 1968; Ishikawa, 1968; Shimada et al., 1971). Sie erscheint aber morphologisch in vieler Hinsicht gleich der in vivo. Ab vierten Tag werden in den Zellen der hier beschriebenen Kultursysteme glatte, tubuläre Auswachsungen (300-600 A) zu wabigen Strukturen des SR gesehen, die mit dem SR durch dünne Röhren verbunden sind. Zuerst besteht kein räumlicher Zusammenhang mit den Fibrillen und dem TS. Doch bald tritt an der Z- Region und an der A/I-Grenze eine enge Beziehung zwischen T- Elementen und Myofilamenten bzw. sarkoplasmatischem Netzwerk auf.
Die TS- Elemente sind im Gegensatz zu in vivo etwas unregelmäßiger in der Anordnung und Verteilung (Ezerman und Ishikawa, 1967; Schüssler, 1971).
Am vierten Tag sind in vitro schon Triaden- Entwicklungen zu sehen, nahe der sich ausbildenden A/I- Grenze bzw. des Z- Bandes. Am dreizehnten Kulturtag sind die Triaden gleich denen materner Muskulatur ausgebildet (Shimada et al., 1967; Ezerman und Ishikawa, 1967). Die Entwicklung einer Basalmembran der Muskelfasern kann nach vier Tagen in der Kultur entdeckt werden (Bischoff und Holtzer, 1969). Diese umgibt gut ausgebildete Muskelfasern, welche keine Myoblasten mehr inkorporieren.
Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß eine Differentiation der Myoblasten in der monolayer- Kultur möglich und in genügendem Maße dargestellt und nachgewiesen wurde.

Über entspechende Untersuchungen an Organkulturen ist noch nichts bekannt, sodaß zur Durchführung des oben diskutierten Vergleiches zwischen in vivo-, monolayer- und Organkultur- Verhältnissen erst die notwendigen Befunde geschaffen werden müssen. Das sollte jetzt möglich sein, da in der Zwischenzeit Techniken entwickelt worden sind, Extremitätenknospen oder Teile davon aus Säugetierembryonen in Organkulturen über mehrere Tage oder sogar Wochen zu züchten und vergleichende Untersuchungen anzustellen (Aydelotte, 1971; Aydelotte und Kochhar, 1972; Kochhar, 1973; Merker et al., 1975 a + b; Neubert et al., 1975 a + b). Mit dieser Methode müßte es elektronenmikroskopisch gelingen, die Differenzierung des Muskelgewebes in der Extremitätenanlage nachzuweisen - falls vorhanden - und zu beschreiben. Dann könnte der oben besprochene Vergleich durchgeführt und zu dem Problem der Bedeutung genetischer, funktioneller und interzellulärer oder Umwelt- bedingter Faktoren Stellung genommen werden. Darüberhinaus dient dieses in vitro- Organsystem als Testmodell für teratogene Untersuchungen (Neubert et al., 1975 b; Merker et al., 1975 b). Eine möglichst genaue Kenntnis aller Vorgänge ist deshalb wünschenswert, nicht zuletzt,um durch Variationen der Technik und Zugabe bestimmter Substanzen die Entwicklung des Muskels hemmen oder stimulieren zu können.

In der folgenden Arbeit soll deshalb die Entwicklung des Skelettmuskels in dem von Aydelotte und Kochhar (1972) entwickelten und von Neubert et al., 1975 a und Merker et al., 1975 a modifizierten Organkultursystem morphologisch dargestellt werden.

Material und Methoden

Mäuse von Stämmen NMRI wurden am Tag 11 + 4 h unter aseptischen Bedingungen entnommen. Die der Befruchtung folgenden 24 Stunden werden als Tag 0 der Schwangerschaft bezeichnet. Den in Hanks BBS bei Zimmertemperatur (höchstens 45 min.) aufbewahrten Embryonen wurden mit Hilfe zweier Starmesser die Knospen der oberen Extremität unter geringer Mitnahme der Thoraxwand abgetrennt und in Wachstumsmedium gespült. Wir verwendeten BGJ (Biggers et al., 1961) mit einem Zusatz von 25 % fetal bovine serum (Bicult Lab.) und 150 ug/ml L- Ascorbinsäure (Merck) (siehe Merker, 1975).
Wie von Aydelotte und Kochhar (1972) angegeben, erfolgte die Kultivation in einer modifizierten Organkultur nach Trowell (1959):

Eine Brücke (V- 4 A- Stahlnetz, 1mm^2 Maschenweite), bedeckt mit einem Membranfilter (Fa. Sartorius) aus Zellulosenitrat (Porengröße 1,2 um), berührt gerade noch das darunter eingefüllte Medium (5 ml) in einer Plastik- Petrischale.
Pro Petrischale (ø 5 cm) wurden zwei Stahlnetzbrücken mit jeweils einem Membranfilterstück eingesetzt. Auf jeden dieser Membranen hatten vier Extremitätenknospen, die nach Randomisierung mit einer Pipette in zufälliger Ausrichtung verteilt wurden, Platz.
Im begasungsfähigen Brutschrank wurden in wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO_2 angereicherter Luft bebrütet. Nach zwei Tagen wurde das Medium gewechselt. Kultiviert wurde bis zu zehn Tagen. Dabei wurden 12- stündig oder täglich Kultur entnommen und fixiert.
Die Fixierung erfolgte in 3 % Paraformaldehyd + 3 % Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer, nachfixiert in 1 % OsO_4 in Cacodylatpuffer mit und ohne Rutheniumrotzusatz.
Dehydrierung : Acetonreihe

Einbettung : Micropal (Fa. Ferak, Berlin)
Schnitther-
stellung : LKB und Reichert- Mikrotome
Kontrastierung: Uranylacetat und Bleicitrat
Aufnahmen : Zeiss EM 1o und Siemens Elmiskop 1o1
Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurden 1 u dicke Mikropal- Schnitte verwendet, die 1 min. in alkalischer Lösung bei 6o^{o} gefärbt wurden.

Befunde (in vivo, Elektronenmikroskopie)

Die im Folgenden beschriebenen Befunde, die sich nicht direkt auf die Muskelentwicklung beziehen, sind ausgiebig in Arbeiten aus diesem Institut besprochen. Einzelheiten können dort nachgelesen werden (Neubert et al., 1975 a + b; Merker et al., 1975 a + b; Schulze- Ehrenburg, 1975; Püschmann, 1975).
Zum besseren Verständnis seien elektronenmikroskopische Befunde von der Entwicklung der entsprechenden Zellen und Gewebe in der vorderen Extremität der Maus in vivo aus dieser Zeitspanne diesem Abschnitt vorangestellt. Bei dieser Beschreibung sollen vorwiegend nur das Muskelblastem und die an der Muskelentwicklung beteiligten Zellen berücksichtigt werden.

Tag 11 + 12 h
Im proximalen Abschnitt der vorderen Extremitätenknospe - der aufgrund des proximo- distalen Reifungsgefälles am weitesten entwickelt ist - sind die Zellen noch undifferenziert. Sie sind groß und plump, liegen dicht zusammen und haben einen großen Kern mit einem großen Nukleolus. Die Zelloberfläche verhält sich unauffällig, d.h. ohne auffällige Fortsatzbildung und ohne spezifische Kontakte zu benachbarten Zellen. Das Zytoplasma enthält wenig Zellorganellen. Viele Ribosomen, teils zu Polysomen zusammengelagert, sind diffus im Zytoplasma verteilt. Langgestreckte Mitochondrien mit wenig Christae liegen in einer aufgehellten Matrix eingebettet. Die wenigen Schläuche des rauhen endoplasmatischen Retikulums sind kurz und eng.
Im distalen Bezirk und unter dem Epithel ist das Gewebe mehr aufgelockert. Die Zellen sind sternförmig, gestreckt, polymorph. Zwischen den Fortsätzen liegen weite Interzellularräume.

Tag 12 + 9 h
Das dichtgepackte Blastem nimmt noch an Größe und Dichte zu. Die Zellen, die aufgrund ihrer Lokalisation als Myoblasten definiert werden können, sind polygonal bis gestreckt, die Zellkontakte enger. Der Abstand zwischen benachbarten Zellen beträgt oft über längere Strecken 2oo A, an den einzelnen Kontaktstellen nur 5o A. Häufig sind die Zellgrenzen nicht immer klar zu erkennen, Verzahnungen und Einbuchtungen werden beobachtet. Im Zytoplasma treten die ersten Filamente auf. Sie sind ungerichtet (1oo A dick) oder schon längsparallel zur Zellachse gelagert (6o-9o A und17o A dick) in der Peripherie zu finden. Die freien Ribosomen sind zu Gruppen angeordnet oder liegen in Ketten vor. Das endoplasmatische Retikulum ist in Form kurzer tubulärer Hohlräume bereits vorhanden. Daneben gibt es polymorphe Zellen mit zahlreichen Ausläufern, einem ovalen, chromatinverdichtetem Kern und reichlich rauhem endoplasmatischem Retikulum, die Fibroblasten.

Tag 13 +14 h
Fortsatzbildungen, Verzahnungen, deutliche Einbuchtungen kleinerer Zellen in langgestreckte Myoblasten, "tight junctions" und Zellgrenzauflösungen bestimmen das Bild im Muskelblastem. Zwischen den Filamenten, die sich in manchen Myoblasten bzw. sich ausbildenden Muskelfasern schon ausrichten, kann man klar die dünnen 7o A- und dicken 17o A-Filamente (Aktin und Myosin) von den 1oo A-Filamenten unterscheiden. Die 7o und 17o A- Filamente richten sich parallel der Längsachse der Muskelfasern, haben eine enge räumliche Beziehung zu gleichlaufenden Mikrotubuli und besitzen Foci dichten Materials (Z- Bandmaterial). Diese Ausrichtung erfolgt von außen beginnend. Im Zellzentrum liegen die noch ungeordneten 1oo A- Filamente. Daneben sehen wir fast nur Polysomen, weiter kurze Retikulumschläuche und an den Zellgrenzen Vesikel.

Tag 14 + 2 h
Die Fusion der Myoblasten zu langgestreckten Fasern bzw. Myotuben, die an ihren Enden Ausläufer besitzen, welche sich mit den entsprechenden Nachbarausläufern verzahnen, sind jetzt deutlich zu sehen. Auch Zellfusionen zwischen unreifen Myoblasten und schon gut entwickelten Muskelfasern sind zu beobachten. Die Zahl der Polysomen in den unreiferen Zellen ist größer. Sie sind kettenförmig und enthalten bis zu 6o Einzelribosomen und lassen das Zytoplasma gegenüber den fibrillenreicheren Zellen dunkler erscheinen. In der Peripherie der Zellen finden wir nun immer mehr Myofibrillen, an denen man Querstreifung erkennen kann. Diese wohl zu erkennenden Sarkomere weisen anfangs noch eingezacktes oder unscharf begrenztes Z-Band und Ribosomenanhäufungen an der A/H- Grenze auf. In Kernnähe (Zentrum) sind zahlreiche kleine Mitochondrien mit stärkeren Cristae angehäuft.
Im extrazellulären Raum kommen Kollagenfibrillen, teils noch isoliert und ungeordnet, oft schon zu Fasern gebündelt sowie granulär- fädrige Strukturen der Proteoglykane und Glykosaminglykane vor (Abb. 1 und 2).

Tag 15 + 7 h
Die Muskelfasern enthalten jetzt gut ausgebildete Sarkomere, das Z-Band ist bereits glatt. Das SR ist gut ausgeprägt und wird in Höhe des Z- Bandes und der A/I- Grenze häufig gesehen. Kontakte mit dem von der Zellgrenze kommenden tubulären Einstülpungen mit dem sarkoplasmatischem Retikulum (Triaden), weniger Polysomen und kaum noch einzelne Myoblasten charakterisieren das Bild. Die Fibrillen füllen das Zytoplasma meist schon vollständig aus. In einigen langen Muskelfasern sind die Kerne durch die Menge der Myofibrillen bereits randwärts gedrängt worden.
Kleine Myoblasten mit länglichem Kern, die Satellitenzellen, lagern sich unterhalb der Basalmembran den Myotuben kappen-

förmig an, ohne mit ihnen zu verschmelzen.

Befunde (in vitro, Lichtmikroskopie)

Tag 11 + 3 bis 6 h
Zum Zeitpunkt des Kultivationsbeginns besteht die Extremitätenknospe in den proximalen Bereichen aus einem dichtgepackten Blastem, in dem noch keine Zeichen einer Gliederung bzw. Differenzierung zu erkennen sind. Mehr distal, unterhalb der epithelialen Scheitelleiste und in den übrigen subepithelialen Bereichen ist das Gewebe aufgelockert, mesenchymähnlich und zwischen den fortsatzreichen bipolaren und retikulären Zellen liegen weite Interzellularräume. Im zentralen Blastem dagegen stoßen die runden plumpovalen oder polygonal angeordneten Zellen so dicht aneinander, daß im lichtmikroskopischen Bereich nur sehr wenige und kleine Interzellularräume erfaßt werden können. Das zentrale Blastem ist weitgehend gefäßfrei (Abb. 3).

Nach einer Kultivationsdauer von 24 Stunden scheint die Anpassung des Explantates an die in vitro- Bedingungen in vollem Gange zu sein. In einer annähernd parallel zur Auflagefläche verlaufenden Mittelschicht kommen eine große Zahl von Zellnekrosen vor. Die nekrotischen Zellen zerfallen und die entstehenden Bruchstücke sind als dichte Granula außerhalb oder nach Phagozytose auch innerhalb von Nachbarzellen nachweisbar. Bereits zu diesem Zeitpunkt, noch deutlicher während der zweiten 24 Stunden in vitro, beginnt die Vorknorpelbildung im proximalen Breich (Abb.4). Hier ist während des dritten Tages die knorpelige Humerusanlage mit einer großen Menge Interzellularsubstanz und einer klaren perichondralen Abgrenzung nach außen voll ausgebildet. Am Ende des vierten Tages finden sich ähnliche Verhältnisse auch bei Radius und Ulna und am Ende des sechs-

ten Tages sind auch die basalen Phalangen voll ausgebildet (Abb. 4 und 5).
Durch die Abgliederung des typischen Knorpels vermittels eines dichten Perichondriums läßt sich die Existenz eines perichondralen Blastems zur Oberfläche bzw. zur Auflage hin sicher nachweisen. Diese um die Knorpelstücke herumliegenden Blasteme müssen in Analogie zu den in vivo-Verhältnissen als Muskelblasteme bezeichnet werden. Der Zellverband besteht im lichtmikroskopischen Auflösungsbereich aus länglichen oder plump- ovalen, relativ kleinen Zellen mit einem großen Kern (Abb. 4 und 5). Sie sind so dicht gepackt, daß mit der hier möglichen Auflösung keine Interzellularlücken nachweisbar sind. Allerdings finden sich - im Gegensatz zu dem "Knorpelblastem" - im Muskelblastem immer kapillarähnliche Gefäße. Weitere Einzelheiten sind mit der verwendeten Methodik (Semidickschnitte, Giemsa- Färbung; Parafinschnitte, H.E.-, PAS-, Toluidinblau- Färbung) lichtmikroskopisch nicht nachweisbar.
Trotz genauer Inspektion lassen sich noch keine deutlichen Zeichen einer Faserbildung erkennen. Allerdings scheinen solche Vorgänge zu beginnen, denn man sieht in einigen Präparaten eine Streckung und dichte reihenförmige Aneinanderlagerung von Zellen (Abb. 5).

Befunde (in vitro, Elektronenmikroskopie)

Die morphologische Ausgangssituation entspricht den in vivo- Verhältnissen, die bereits weiter oben beschrieben wurden. Es muß darauf hingewiesen werden, daß auch in vitro noch das in vivo so deutlich ausgeprägte proximo- distale Reifungsgefälle existiert. Während also am Beginn der Kulturperiode (Tag 11 + 3 bis 6 h) ein typisches dichtgepacktes Blastem mit plumpen, undifferenzierten Zellen nur im proximalen Bereich vorhanden ist, finden wir nach zwei oder

drei Tagen Aufenthalt in der Kultur dieses Gewebe auch weiter distal, z.B. am Unterarm oder sogar im Handbereich. Dieses Verhalten der zeitverschobenen distalwärts Bewegung der Reifung läßt sich deutlich in der Abb. 6 nachweisen, auf der ein typisches Blastem aus distalen Bezirken nach einer Kultivationsdauer von drei Tagen dargestellt ist.

Nach Gliederung des ursprünglich einheitlichen Blastems in den zentral gelegenen Knorpel, das umgebende Perichondrium und das nach außen hin lokalisierte Muskelblastem läßt sich am fünften Tag im Humerusbereich folgendes elektronenmikroskopische Bild der Muskelanlage erfassen:

Auch hier soll darauf hingewiesen werden, daß nur die Bereiche und Zellen berücksichtigt werden, die im Gebiet des Muskelblastems liegen und direkte Beziehungen zur Muskelentwicklung aufweisen. In diesem Muskelblastem überwiegen ovale Zellen, deren Oberfläche bis auf einige plumpe Fortsätze relativ glatt ist (Abb. 7). Die Zellen sind dicht gepackt, jedoch finden sich in den Zwickeln deutliche Interzellularräume. Die Membranen der entsprechenden Nachbarzellen verlaufen auf längeren Strecken annähernd parallel zueinander. Der Abstand zwischen den beiden Membranen beträgt in langen Abschnitten etwa 2oo A, an einzelnen Stellen nähern sich diese Membranen bis auf 5o A bei noch erhaltenem Interzellularraum (close contacts) oder aber ihre äußeren Lamellen verschmelzen unter Verlust des ICR völlig (tight junction oder zonula occludens). Die Feinstruktur des Zytoplasmas dieser Zellen ist typisch embryonal und entspricht proliferierenden und noch nicht differenzierten Zellen. Es überwiegen freie Ribosomen, die zu Polysomen-Gruppen angeordnet sind. Daneben kommen einige kurze Hohlräume des rauhen endoplasmatischen Retikulums, einige kleine Matrix- und Cristae- arme Mitochondrien sowie wenige kleine Vakuolen und Granula vor.

Der große Kern ist vorwiegend rund. Chromatinverdichtungen findet man in Form kleiner Plaques und in der Peripherie wird immer ein mittelgroßer Nukleolus beobachtet (Abb. 8, 9 und 1o). Ähnliche Bilder findet man - wie oben schon erwähnt - im Bereich von Radius und Ulna einen Tag später, zwei Tage später im distalen Handbereich.

Nach einer Kultivationsdauer von ein bis fünf Tagen lassen sich im proximalen Abschnitt in diesem dichtgepackten Muskelblastem auch erste Zeichen einer Fusion der Myoblasten elektronenmikroskopisch erfassen (Abb. 8, 9 und 1o). Die Zahl und Länge der "close contacts" und "tight junctions" nimmt zu. Gleichzeitig treten gehäuft Kontaktabschnitte auf, in deren Bereich die Membranen der benachbarten Zellen nicht mehr sicher zu identifizieren sind. Wie in anderen Arbeiten (siehe Einleitung) ausgiebig diskutiert wurde, kann dieses Bild natürlich durch Schnittwinkel etc. entstehen. Das vermehrte Auftreten und die Befunde mit Kipptischeinrichtung sprechen aber doch für die reale Existenz solcher Vorgänge. Vereinzelt fehlen auch begrenzende Zellmembranen in diesen Abschnitten.

Im Zytoplasma der in dem anfangs beschriebenen proximalen Abschnitt vorkommenden Zellen treten nach einer Kultivationsdauer von fünf Tagen die ersten deutlich nachweisbaren Filamente auf. Es handelt sich einmal um isoliert vorkommende und regellos verlaufende Filamente von 1oo A Dicke (Abb.11). Diese Filamente sind nur in Fortsätzen paralleler und etwas dichter gepackt.

Außerdem kommen häufig dicht unterhalb der Zellmembran oder in langgestreckten flachen oder fingerförmigen Fortsätzen Bündel von Filamenten vor, die sich nur schlecht klar identifizieren lassen (Abb. 12). Wenn eine Messung mit Sicherheit gelingt, sind die Durchmesser häufig kleiner als 7o A. Auffällig ist, daß in oder in der Umgebung

solcher Bündel keine anderen Filamenttypen vorkommen. Es muß zum besseren Verständnis darauf hingewiesen werden, daß beide Filamenttypen bereits in den Kontrollen vom Tag 12 und auch noch ein Tag in der Kultur vorkommen.
Daneben kommen ab Tag 5 ein dritter und vierter Filamenttyp vor, die sich durch ihre Dicke (6o- 9o A bzw. 15o-17o A) unterscheiden und immer schon eine gemeinsame Bündelung aufweisen. Besonders deutlich wird das gemeinsame Vorkommen in solchen Bündeln auf Querschnitten vom Tag 6 in vitro (Abb. 16 bis 19, besonders Abb. 19).
Die Packungsdichte der dicken und dünnen Myofilamente ist normal und entspricht den in vivo- Verhältnissen. Ein Unterschied besteht jedoch: Die Bündel sind nach aussen nicht so scharf abgegrenzt, sondern erstrecken sich unregelmäßig in die Umgebung (siehe Abb. 16). Es kommen sogar an der Peripherie der Bündel oder in einiger Entfernung davon einzelne dicke Filamente vor, die von einigen dünnen Filamenten umgeben werden. Die Myofibrillen sind bereits parallel zur Längsachse der Zellen (Muskelfasern) ausgerichtet.
Auf Längsschnitten wird deutlich, daß eine echte Sarkomereneinteilung noch nicht existiert (Abb. 13 bis 15). Klar begrenzte Z-Streifen lassen sich nicht darstellen. Höchstens plaques- artiges, feinfilamentär- elektronendichtes Material kommt im Verlauf der Myofibrillen vor. In Analogie zu anderen Arbeiten über die Myogenese können diese Ablagerungen als Beginn der Z- Streifenbildung betrachtet werden.
Einige Hohlräume des rauhen und glatten endoplasmatischen Retikulums (sarkoplasmatisches Retikulum SR) sind vorhanden. Die Herstellung einer klaren räumlichen Beziehung dieser membranbegrenzten Hohlräume zu den Myofibrillen gelingt nicht zuletzt durch das Fehlen der Z- Streifen nicht.
Die Zahl der Ribosomen hat in den Zellen mit Myofibrillen

etwas abgenommen. Allerdings tritt gerade hier die Gruppierung zu Polysomen besonders deutlich hervor (Abb. 13 bis 19). Vereinzelt findet man auch die langgestreckten Polysomen, an denen die einzelnen Ribosomen schraubenförmig oder gegeneinander versetzt dem m- RNS- Faden aufsitzen.

Die Zahl der Mitochondrien ist relativ gering. Auch die Zahl, Packungsdichte der Cristae und die Menge der Matrix ist nicht groß. Allerdings sind diese Organellen häufig bereits ovalgestreckt parallel den Myofibrillen. Daneben finden sich im Zytoplasma dieser Zellen einzelne kleinere Vakuolen und Granula.

Eine Zunahme der Zahl, Dichte und Länge der Myofibrillen in den nächsten zwei Tagen (Tag 7 und 8 in vitro) ist gering. Durch Querschnitte wird auch hier noch die periphere Lage der Myofibrillen in manchen Muskelfasern deutlich. In Höhe des nicht sicher identifizierbaren zukünftigen Z-Streifens finden sich noch ungeordnete Hohlräume des SR. Daneben lassen sich Einstülpungen des Sarkolemms und Vesikel dicht unter dem Sarkolemm nachweisen, die - in Analogie zu den in vivo- Verhältnissen - durchaus in Beziehung zu den Sarkomeren stehen können. Es könnte sich also um das sich entwickelnde tubuläre System handeln. Trotz genauen Suchens ist aber die Zahl der Zellen, die Myofibrillen enthalten, gering. Sie kommen, offenbar geprägt durch lokale Muskelanlagen, nur in umschriebenen Bezirken vor. Die Breite solcher Muskelanlagen umfaßt nur zwei bis drei Zellschichten.

Diskussion

Zur Beurteilung der Myogenese in der von uns verwendeten Organkultur von Extremitätenknospen, die Mäuseembryonen am Tag 11 entnommen wurden, müssen diese Vorgänge mit den Befunden unter in vivo- und "monolayer"- Kultur- Verhältnissen verglichen werden. Sowohl über die normale in vivo-Myogenese als auch über die Differenzierung von Muskelblastem in der monolayer- Kultur liegen umfassende Beschreibungen vor, sodaß sie als Grundlage eines derartigen Vergleiches verwendet werden können (Shimada, 1966 und 1971; Shimada et al., 1967; Okazaki und Holtzer, 1965; Holtzer et al., 1957; Ishikawa, 1968; Schüssler, 1971; Konigsberg, 1963).
In diesem Institut hat Schüssler (1974) in einer größeren Arbeit die normale Entwicklung der Extremitätenmuskulatur beim Hühnchen beschreiben. Eine entsprechende Arbeit vom Mäuseembryo ist in Vorbereitung (Borck, in Vorbereitung). Dadurch sind ausreichende Erfahrungen und Bildmaterial für diese Oberlegungen und Vergleiche vorhanden.

Ohne jeden Zweifel erreicht die Muskelentwicklung in der Extremitätenknospen- Organkultur weder quantitativ noch qualitativ die Höhe und Ausprägung der entsprechenden Vorgänge in vivo oder in der monolayer- Kultur.
Zusammenfassend kann gesagt werden, daß in vivo bereits am Tag 14 - also vier Tage nach Entnahme für die Kultur - die Muskulatur einen hohen Reifungsgrad aufweist (siehe Borck, unveröffentlicht). Zwar liegen die Kerne noch nicht randständig, aber das Zytoplasma enthält reichlich Myofibrillen, die klar definierte Z- Streifen und damit eine Sarkomerengliederung zeigen. Das longitudinale System (sarkoplasmatische Retikulum) und das transversale tubuläre System sind zu diesem Zeitpunkt bereits gut ausgebildet, liegen schon andeutungsweise an typischer Stelle und ha-

ben schon Beziehung zueinander aufgenommen. Die Zahl der Myoblasten ist gering, d.h., der größte Teil ist bereits zu Muskelfasern verschmolzen.
In den "monolayer"- Kulturen (Okazaki und Holtzer, 1965; Bischoff und Holtzer, 1969; Lipton und Konigsberg, 1972; O'Neill und Stockdale, 1972) erfolgt die Bildung von Muskelfasern und deren Differenzierung auch etwa in diesem Zeitabschnitt (3 bis 4 Tage). Bei direkter Beobachtung dieser Vorgänge, die bei der in vitro- Technik möglich ist, haben die Autoren sogar den Eindruck einer Synchronisation der Fusion und der Myofibrillenentstehung. Unter diesen Bedingungen entwickelt sich in der "monolayer"-Kultur im Gegensatz zur in vivo- Normalentwicklung das intrazelluläre Hohlraumsystem (l- und t- System = Longitudinal- und Transversal- System oder SR bzw. TS), das für die intrazelluläre Erregungsleitung und die elektromechanische Kopplung verantwortlich ist, überschießend (Ezerman und Ishikawa, 1967; Ishikawa, 1968).
In der von uns untersuchten Organkultur von Extremitätenknospen beginnt eine deutlich morphologisch erfaßbare Myofilamentbildung erst nach einem Aufenthalt von fünf Tagen in der Kultur. Fusionsvorgänge lassen sich allerdings schon früher nachweisen. Die Anzahl der Zellen, die sich zu Muskelzellen entwickeln, ist verglichen mit einer in vivo gewachsenen Extremitätenknospe deutlich geringer. Die Myofilament- bzw. Myofibrillenzahl entspricht in einigen Zellen dem Vergleichsbild, in anderen dagegen nicht. Deutliche Unterschiede bestehen im Bereich des Z- Streifens, der fast vollständig fehlt und dadurch auch eine Sarkomeren- Gliederung vermissen läßt. Das intrazelluläre Hohlraumsystem (l- und t- System) zeigt ebenfalls keine Neigung zur Reifung.
Auf der Grundlage dieser Befunde können jetzt die Myogenese- Vorgänge unter den drei geschilderten Bedingungen miteinander verglichen und der Versuch unternommen werden,

die Faktoren, die diese Unterschiede bedingen, zu analysieren.

Die geringe Zahl der sich zu Fasern differenzierenden Zellen in unserem in vitro- System muß auf die speziellen räumlichen Verhältnisse zurückgeführt werden. Durch die Ausbreitung der Extremitätenknospe auf dem Membranfilter und die am Anfang ablaufenden Nekrosevorgänge ist die Menge des Muskelblastems von Anfang an viel geringer als in vivo. Die Differenzierung in der Muskelzelle selbst muß aber auf andere Ursachen bezogen werden. Zunächst muß entschieden werden, ob es sich nur um eine Verzögerung der Differenzierung handelt. Solche Verzögerung könnte durch die Nekrosephase, durch die Adaptation an in vitro-Verhältnisse und natürlich auch durch die besonderen in vitro-Verhältnisse (Nährmedium, Gasgemisch etc.) erklärt werden. Diese Erklärung ist jedoch wenig wahrscheinlich. Einmal konnte gezeigt werden, daß in der "monolayer"- Kultur trotz tiefgreifender präparativer Eingriffe (mechanische Zerkleinerung, Trypsinierung, Problem der Haftung, Untergrund) die Muskelfaserbildung schnell wieder in Gang kommt. Außerdem konnte in einzelnen Extremitätenknospen, die zehn Tage kultiviert waren, keine zunehmende Reifungstendenz gefunden werden. Da die "monolayer"- Kultur für die Entwicklung von Muskel geeigneter erscheint, kann die nervöse Versorgung und die spezifische Funktion, die in beiden Systemen nicht vorhanden sind, keine Rolle spielen. Aus Arbeiten anderer Autoren läßt sich ablesen, daß diese beiden Faktoren für die Frühdifferenzierung des Muskels offenbar keine Rolle spielen (Golisch et al., 197o).
Bei Denervierung oder Umpflanzungen von Nerven können das funktionelle Verhalten, das Enzymsystem und die Menge der Strukturen (Myofibrillen, Mitochondrien, l- und t- System) verändert werden, das prinzipielle Bild der Muskelfaser bleibt aber erhalten.

Die Unterschiede zwischen dem Bild der "monolayer"- Kultur und der Organkultur müssen deshalb auf Faktoren bezogen werden, die im Organkultursystem selbst liegen. Hier kommen Ursachen in Frage, die entweder als exogen (Medium, Gasgemisch, Unterlage etc.) oder als endogen bezeichnet werden können. Endogene Faktoren müßten in dem Gewebe der Kultur selbst gesucht werden. Hier kommen die veränderten eigenartigen dreidimensionalen Bedingungen in Frage (Nekrose, Abflachung), die schon weiter oben diskutiert wurden. Es scheint aber auch ein Zeitfaktor eine Rolle zu spielen. Nach eigenen Erfahrungen ist die Muskelentwicklung in den Kulturen, die erst am Tag 12 entnommen wurden, besser vorangekommen. Aydelotte und Kochhar (1972) deuten eine Abhängigkeit des Differenzierungsverhaltens von der Somitenzahl ebenfalls an. Schließlich hängt die Muskeldifferenzierung auch vom mechanischen und chemischen Verhalten der mesenchymalen Interzellularsubstanz ab. Dafür liegen aber an diesem in vitro- System noch keine Befunde vor, so daß keine Stellung zu diesem Aspekt genommen werden kann. Die Postulierung von Hemmfaktoren, die vereinzelt diskutiert werden (Merker, persönliche Mitteilung), scheint noch nicht gerechtfertigt. Sehr viel wahrscheinlicher ist das Mitspielen äußerer Faktoren. Das von uns verwendete in vitro- System scheint ideal für die Differenzierung des Skelettsystems (Aydelotte, 1971; Aydelotte und Kochhar, 1972; Merker et al., 1975 a; Neubert et al.,1975 a) zu sein. Es kann vermutet werden, daß die Kulturbedingung für diese Entwicklung sehr geeignet ist. Für eine Muskeldifferenzierung aber müssen offenbar andere Medien gefunden werden. Dafür spricht, daß Ellison et al. (1969) in einem Hühnchenembryo- Somitensystem die Myogenese durch verschiedene Nährmedien selektiv auch gegenüber der Chondrogenese stimulieren bzw. inhibieren konnten.

Es scheint deshalb berechtigt, den Unterschied zwischen dem Organkultur- und "monolayer"- System zunächst auf fol-

gende Ursachen zu beziehen:

1. die Verringerung des Muskelblastem durch Nekrosen und Abflachung,
2. die geringe Eignung der "Umwelt" in vitro (Nährmedium etc.) für die Muskelreifung,
3. einen Zeitfaktor, über dessen Bedeutung noch nichts Sicheres bekannt ist. Am Tag 12 entnommene Kulturen zeigen aber eine bessere Muskeldifferenzierung.

Das genetische System dieser Zellen ist aber trotz der erschwerten Bedingungen in der Lage, die Grundphänomene der Muskeldifferenzierung ablaufen zu lassen. Alle beteiligten Strukturen und Vorgänge sind vorhanden:
Fusionen, typische Polysomen, drei Filamentarten, Bündelung der Myofilamente, das Z- Streifenmaterial, Hohlräume des endoplasmatischen Retikulums. Gestört ist offenbar die Verknüpfung aller dieser Bestandteile zu einer funktionellen Einheit. Der Z- Streifen definiert sich nicht, dadurch ist die Peripherie der Myofibrillen unregelmäßig begrenzt und die Sarkomerenstruktur entsteht nicht. Gleichzeitig bleibt die Entwicklung einer engen räumlichen Ordnung zwischen den Sarkomeren und dem intrazellulären Hohlraumsystem aus, das charakteristische l- und t- System bildet sich also nicht.

Unklar ist auch in dieser Arbeit die Bedeutung der 1oo A dicken Filamente geblieben. Ihre Existenz wärend der Myogenese wird zwar häufig beschrieben (Ishikawa, 1968; Kelley, 1969; Schüssler, 1971), über ihren chemischen Charakter und ihre Funktion ist aber nichts genaues bekannt. Am glaubhaftesten erscheint noch die Deutung, daß es sich um Myosin- oder Aktin- Filamente mit anderem Polymerisationsgrad handelt.
Die Bündel nur schlecht definierbarer Filamente, welche in

den Befunden beschrieben wurden, müssen nicht direkt mit der Myogenese in Verbindung gebracht werden. Sie entsprechen den Filamenten in nichtmuskulären Zellen, die hier offenbar ein primitives kontraktiles System darstellen (von Keyserlingk, 1969). Die Zellen, die diese Filamentart enthalten, stellen deshalb wahrscheinlich Mesenchymzellen und keine Muskelblastemzellen dar.

Zusammenfassung

Es wurde die Myogenese unter Organkulturverhältnissen (eine modifizierte Trowell- Kultur) untersucht, um sie den Befunden von in vivo- Verhältnissen und aus "monolayer"- Kulturen gegenüberzustellen. Dazu verwendeten wir vordere Extremitätenknospen von 11 Tage alten Mäuseembryonen, die während 8 Kulturtagen licht- und elektronenmikroskopisch untersucht wurden.

1. In der Organkultur existiert das proximo- distale Reifungsgefälle ebenso wie in vivo. Die typischen Blasteme traten am ersten Kulturtag nur proximal, später auch distal auf.
2. Am Anfang der Kultur (1 - 4 Tage) kommen in den Zellen des peripheren Muskelblastems unregelmäßig verlaufende 1oo A dicke Filamente und schlecht definierbare dünne Filamentbündel vor.
3. Die Verschmelzungstheorie wurde an unseren Extremitätenknospen in vitro bestätigt.
4. Nach 5 Kulturtagen werden in der Organkultur typische Myofilamente sichtbar, die zu unscharf abgegrenzten Myofibrillen gebündelt wurden. Die Aggregation der dicken und dünnen Myofilamente und die Ausrichtung längsparallel zur Muskelfaserachse erfolgte ebenso, wie in vivo bzw. in der "monolayer"- Kultur. Deutliche Sarkomeren- Bildung sahen wir in unserer Organkultur jedoch nicht. Plaques elektronendichten Materials in Höhe des zukünftigen Z- Bandes weisen auf die beginnende Ausbildung eines solchen hin. Myofibrillenzahl, Dicke und Länge nehmen vom 6. bis 8. Kulturtag kaum zu.
5. Ebenso scheint die TS- und SR- Entwicklung, im Gegensatz zur überschießenden Entwicklung in "monolayer"- Kulturen, in unserer Organkultur keine Neigung zur Reifung zu haben.
6. Ribosomen bilden lange Polysomenketten. Die Abnahme dieser mit Zunahme von Myofibrillen im Zytoplasma entspricht

normalen und "monolayer"- Kultur- Verhältnissen, wie auch die anderen Zellorganellen keine auffälligen Veränderungen zeigten.

Diskutiert wurde der Vergleich zwischen dem relativ hohen Reifungsgrad in vivo, der nach 14 Tagen im Zytoplasma der Muskelfasern reichlich gut ausgeprägte Myofibrillen in Sarkomerengliederung aufweist, ebenso wie sie sich in "monolayer"- Kulturen in etwa der gleichen Zeit herausbilden und unseren Organkulturen, mit ihrer qualitativ und quantitativ geringer ausgeprägten Muskelentwicklung.
Adaptationsbedingte Verzögerung ist unwahrscheinlich, da sie in "monolayer"- Kultur die Reifung nicht verhindert, ebenso wie die fehlende nervale Beeinflussung. Vielmehr scheinen Ursachen, die in dem Organkultursystem selbst liegen, zu dem unterschiedlichen Entwicklungsbild zwischen "monolayer"- Kultur und Organkultur führen, wie:

1. die veränderten eigenartigen dreidimensionalen Bedingungen, die zur Verringerung des Muskelblastems durch Nekrose und Abflachung führen,
2. die geringe Eignung des Nährmediums für die Muskelreifung,
3. ein noch nicht in seiner vollen Bedeutung erkannter Zeitfaktor.

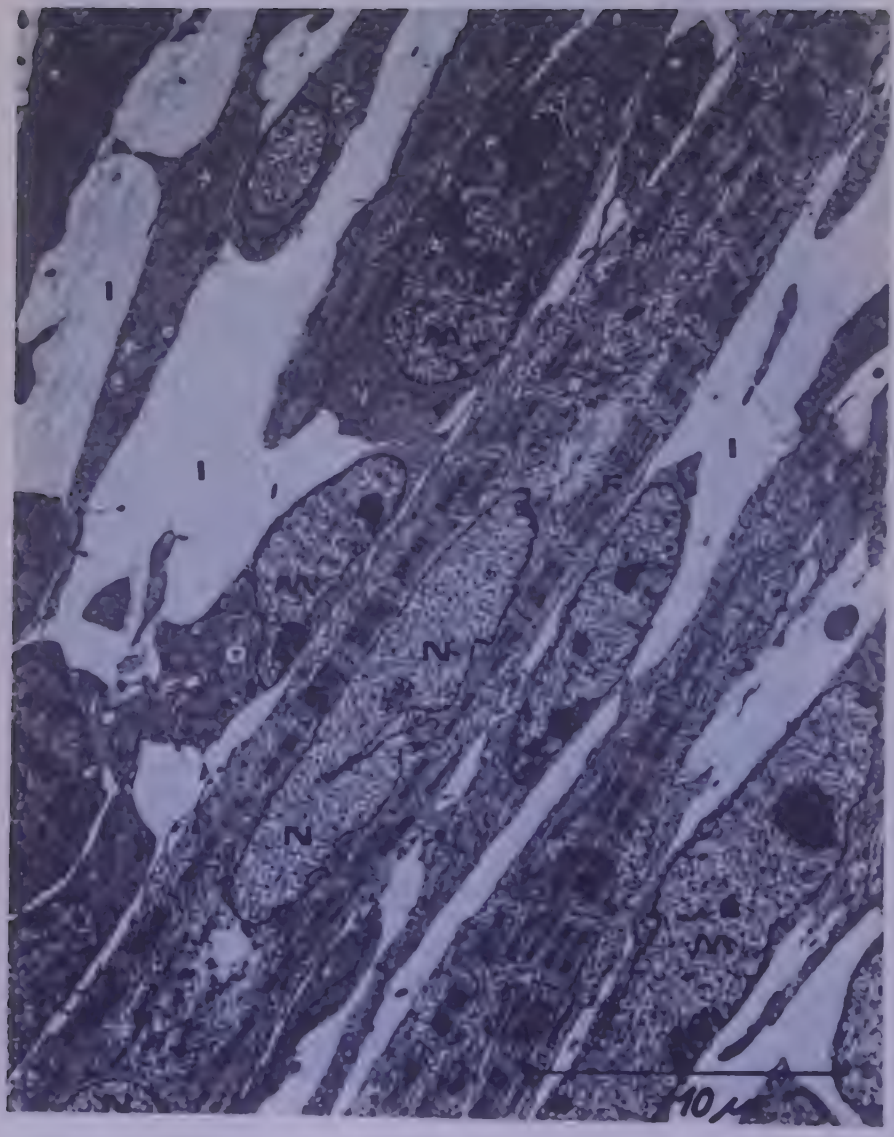
Unklar ist auch die Bedeutung der 1oo A- Filamente, die andere Autoren gleichfalls bei Myogenese- Untersuchungen beschrieben.

Bildmaterial

Abb. 1) Obersichtsbild von einer Muskelanlage aus der oberen Extremität eines Mäuseembryos vom Tag 14 + 8 h. In den Muskelfasern noch zentral liegende Kerne (N) und zahlreiche Myofibrillen (F), daneben Mesenchymzellen, wahrscheinlich Fibroblasten.
I = mesenchymaler Interzellularraum
Vergrößerung 1 : 6 3oo

Abb. 2) wie Abb. 1 bei höherer Vergrößerung
N = Nukleus einer Muskelfaser
M = Mesenchymzelle
I = Interzellularraum einer Mesenchymzelle.
In der Muskelfaser vorwiegend peripher lokalisierte Myofibrillen mit deutlichem Z- Streifen (Z), I- Band (IB) und A- Band mit zentralem H-Streifen (Pfeil). Zwischen den Myofibrillen Zellorganellen:
Mi = Mitochondrium
G = Glykogen
und zahlreiche Ribosomen.
Vergrößerung 1 : 33 25o

N
IB
IB
G
IB
M
Z
I


I
I
I
N
N
N
N
10 µ

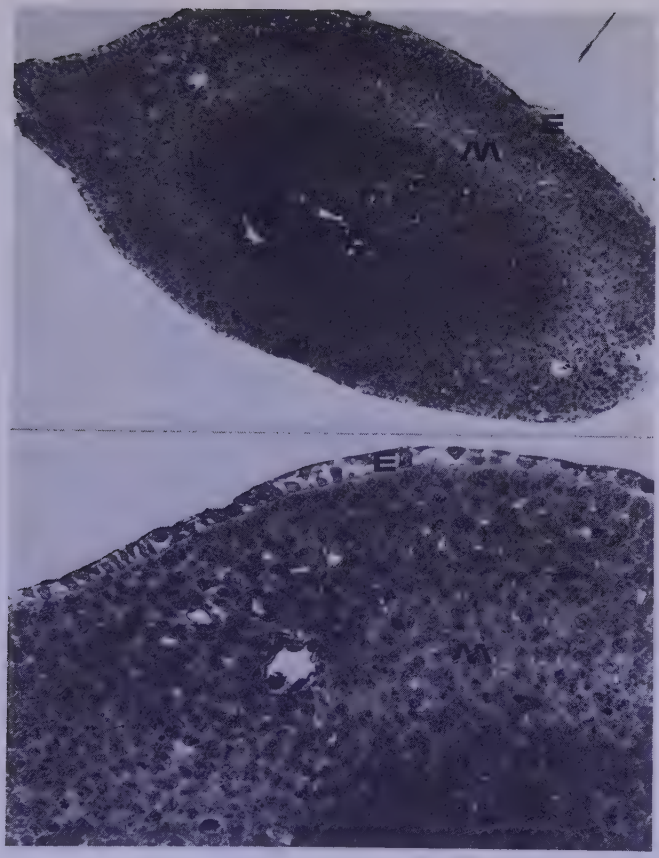


Abb. 3 a) Lichtmikroskopische Aufnahme von einem Schrägschnitt durch die Extremitätenknospe am Beginn der Kultur (Tag 11 + 3 h) mit zentralem Blastem (B), peripherem Mesenchym (M) und bedeckendem Epithel (E).
Vergrößerung 1 : 112

b) wie a, höhere Ausschnittsvergrößerung
Vergrößerung 1 : 280

Abb.4a) Extremitätenknospe nach einer Kultivationsdauer von 6 Tagen, metacarpaler Bereich mit Knorpelbildung (K), Perichondrium (P), Muskelblastem (MB) und Epithel (E).
Vergrößerung 1 : 28o

b) wie a im Schrägschnitt
Zusätzlich wird noch lockeresmesenchymales subepitheliales Gebiet (M) deutlich.
Vergrößerung 1 : 28o

c) Nach einer Kultivationsdauer von 3 Tagen beginnende Knorpelbildung (K), noch ohne deutliche Abgrenzung zum Muskelblastem (MB).
Vergrößerung 1 : 56o

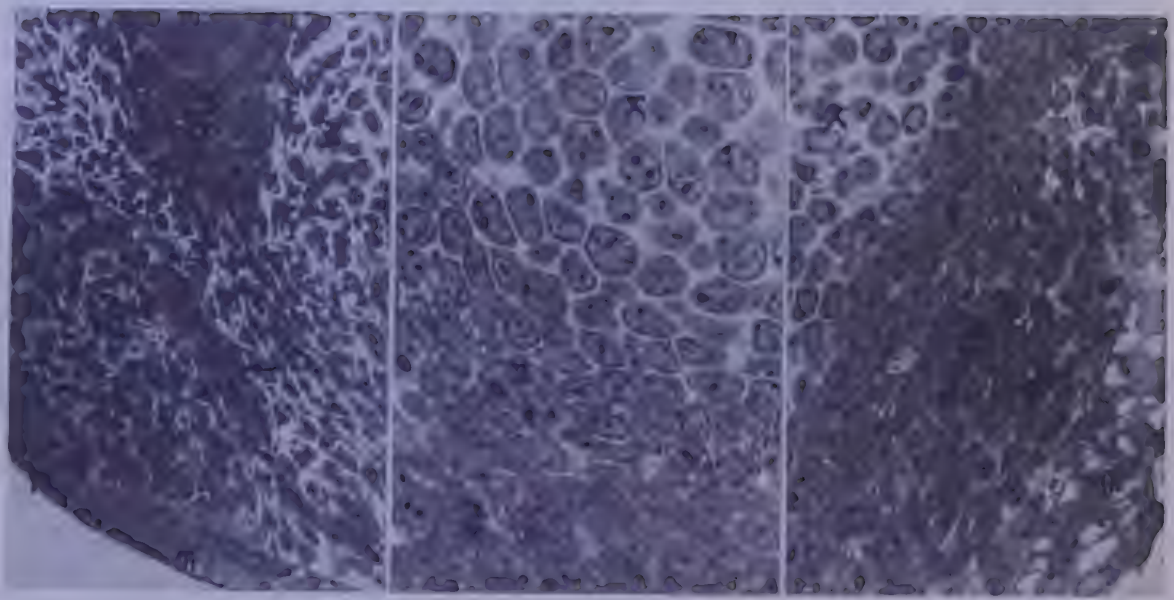
Abb.5a) Kultivationsdauer 5 Tage, Muskelblastem (MB) im Bereich zwischen Epithel (E) und Knorpel (K).
Vergrößerung 1 : 9oo

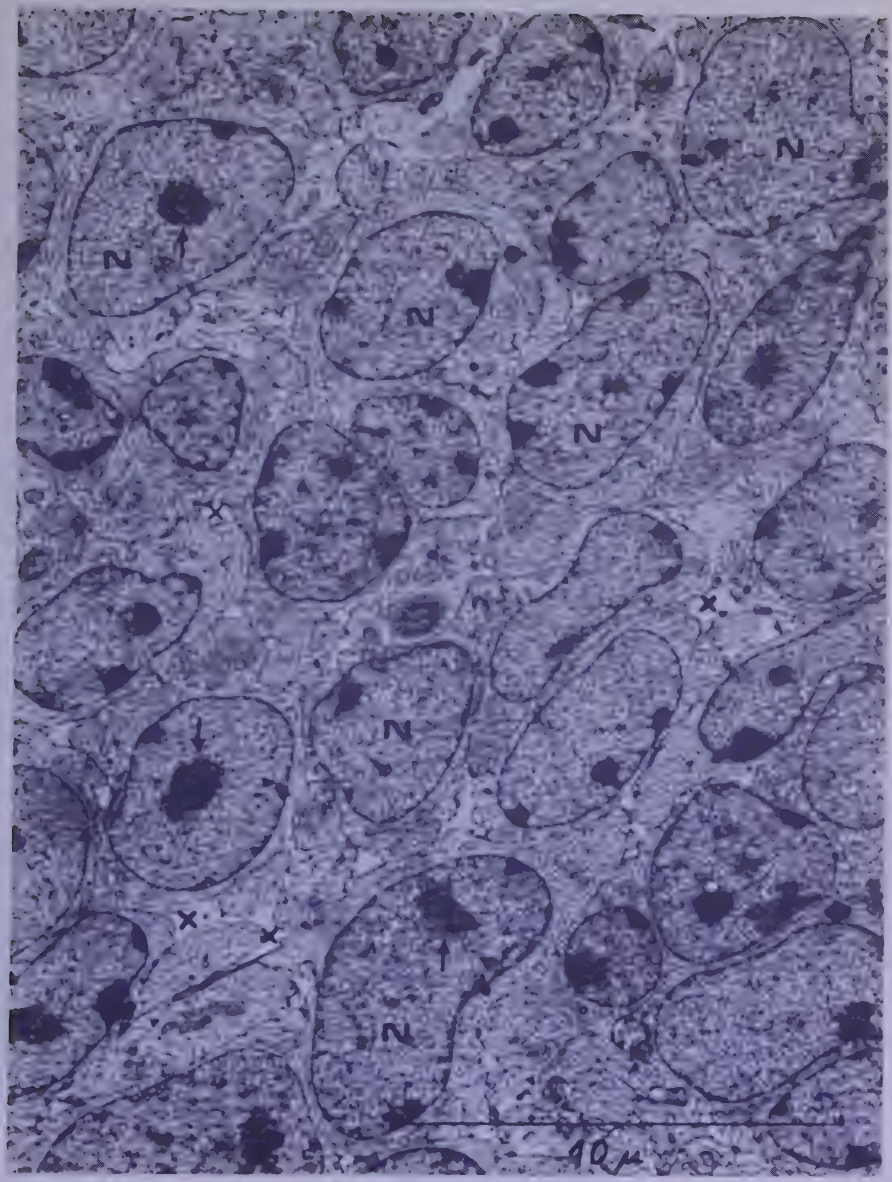
b) wie a mit beginnender Perichondriumbildung zwischen Knorpel (K) und Muskelblastem (MB)
Vergrößerung 1 : 112o

c) Kultivationsdauer 6 Tage
Muskelblastem (MB), Mesenchym (M), Epithel (E) und strangförmige Zellverbände (Pfeil)
(Muskelanlage ?)
Vergrößerung 1 : 56o

Abb. 6) Extremitätenknospe nach einer Kultivationsdauer von 3 Tagen. Blastem aus dem distalen Bereich mit dichtgepackten, kontaktfreudigen Epithelzellen. Nur einzelne Interzellularräume (x), große Kerne (N) mit deutlichen Nukleoli (Pfeil), im Zytoplasma vorwiegend freie Ribosomen, einzelne Hohlräume des rauhen endoplasmatischen Retikulums und Mitochondrien.
Vergrößerung 1 : 84oo

E
E
MB
P
P
K
K
E
E
M
MB
P
K
K
MB




N
N
N
N
N
N
X
X
X
X
10 μ

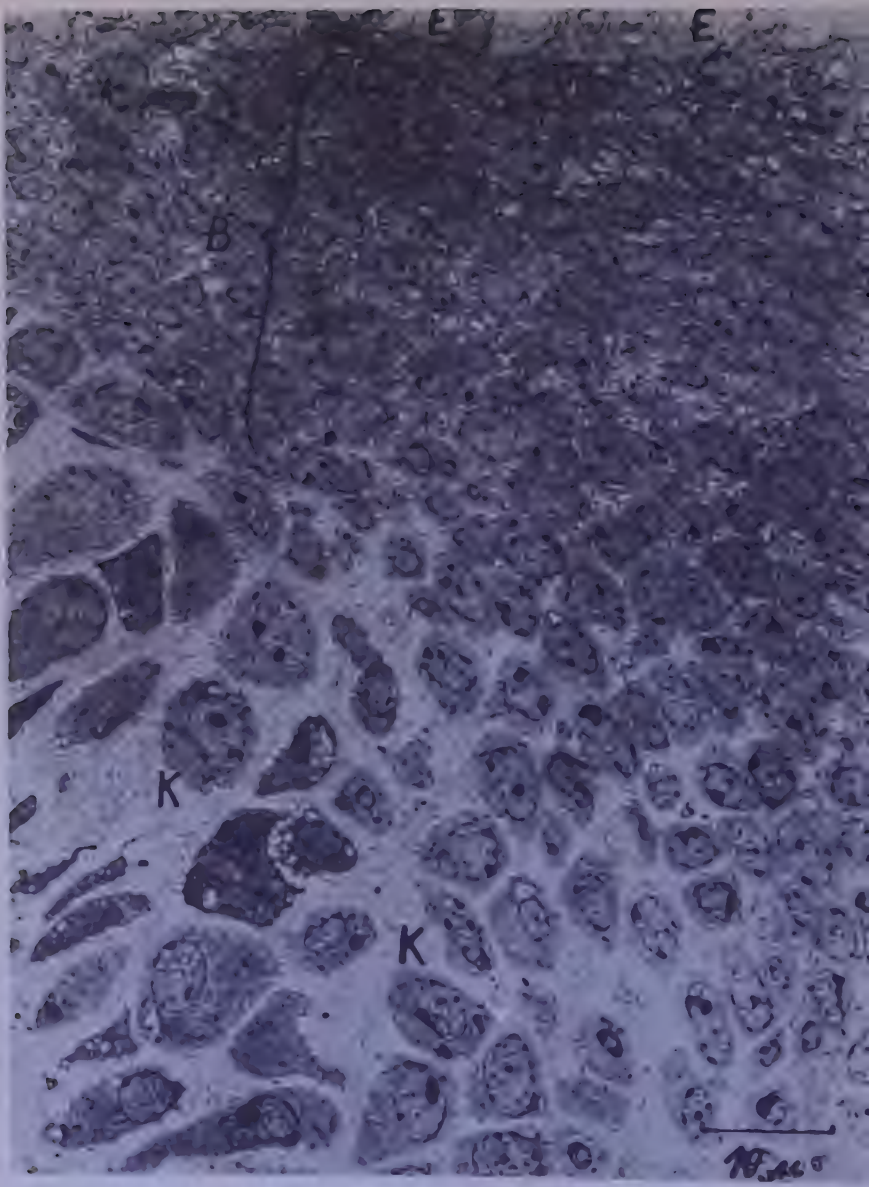


Abb. 7) Elektronenmikroskopisches Übersichtsbild von einer Extremitätenknospe nach einer Kultivationsdauer von 5 Tagen mit Knorpelgewebe (K), Epithel (E) und dazwischen blastemartigem Gewebe (B). Vergrößerung 1 : 2400

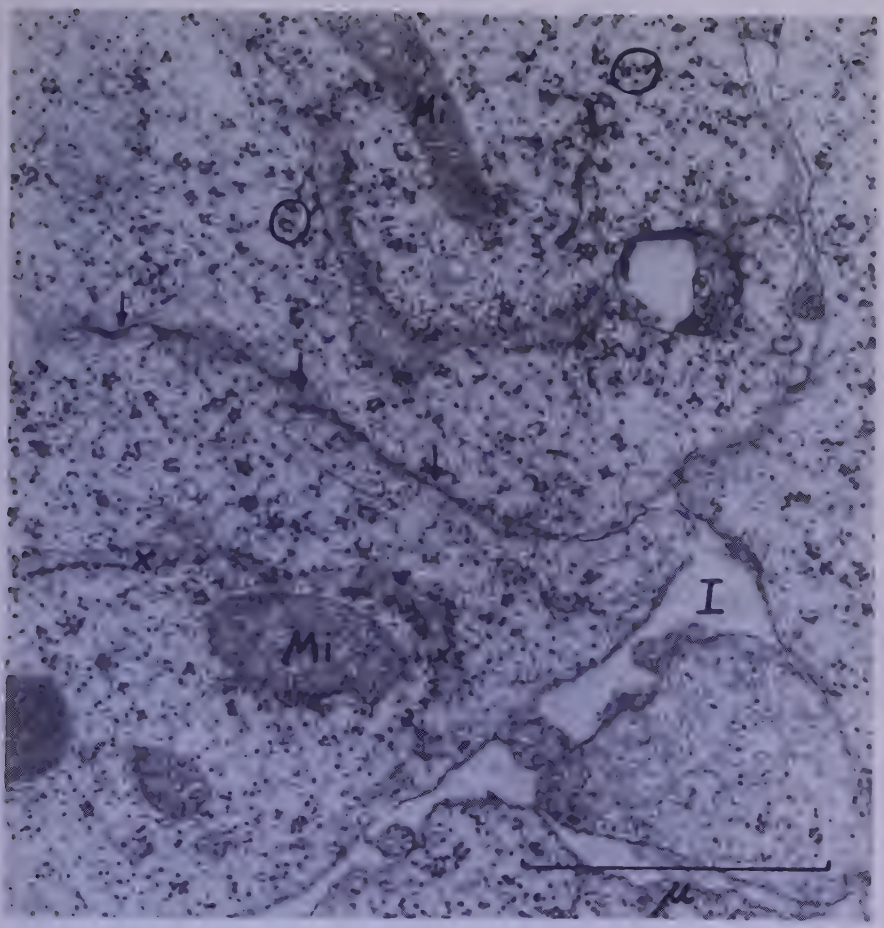


Abb. 8) Unkultivierte Extremitätenknospe vom Tag 12 mit dichtgepacktem Blastem und fraglicher Zellmembranauflösung (Pfeil), Mitochondrien (Mi), Hohlräumen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (x), freien Ribosomen (O) und Interzellularraum (I). Vergrößerung 1 : 6o ooo

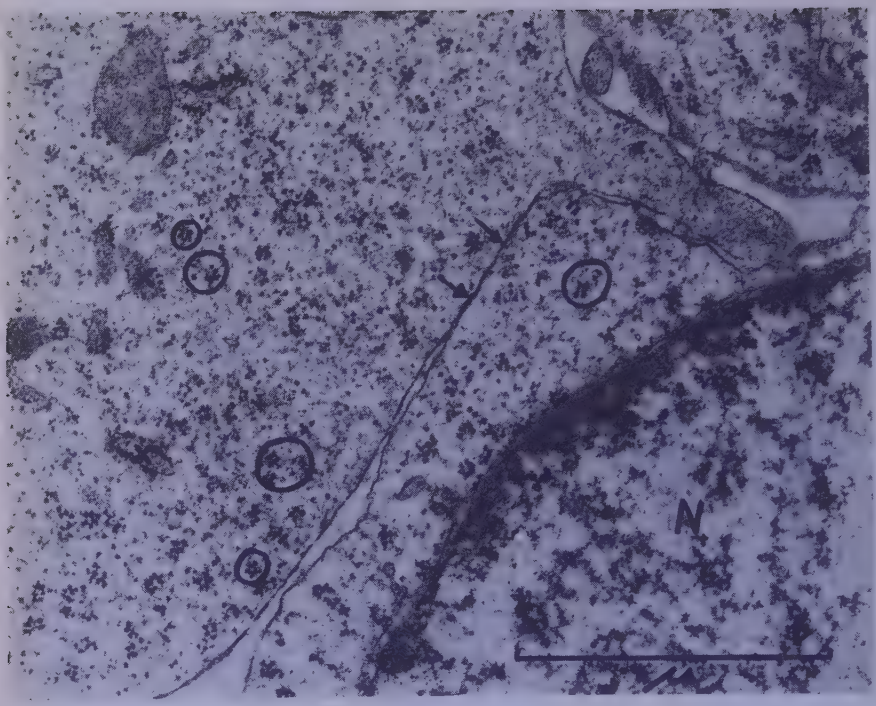


Abb. 9) Kultivationsdauer 24 Stunden
Enger Zellkontakt (Pfeil) zwischen Myoblasten. Im Zytoplasma zahlreiche Polysomengruppen (O) und einzelnen Hohlräumen des rauhen endoplasmatischen Retikulums
Vergrößerung 1 : 61 200

Abb.1o) Kultivationsdauer 3 Tage
Dichte Zellkontakte (Pfeil) zwischen verzahnten Myoblasten, z.T. "tight junctions" (Pfeil mit Querbalken). An einer Stelle (*) fehlt die Zellmembran.
Vergrößerung 1 : 5o ooo

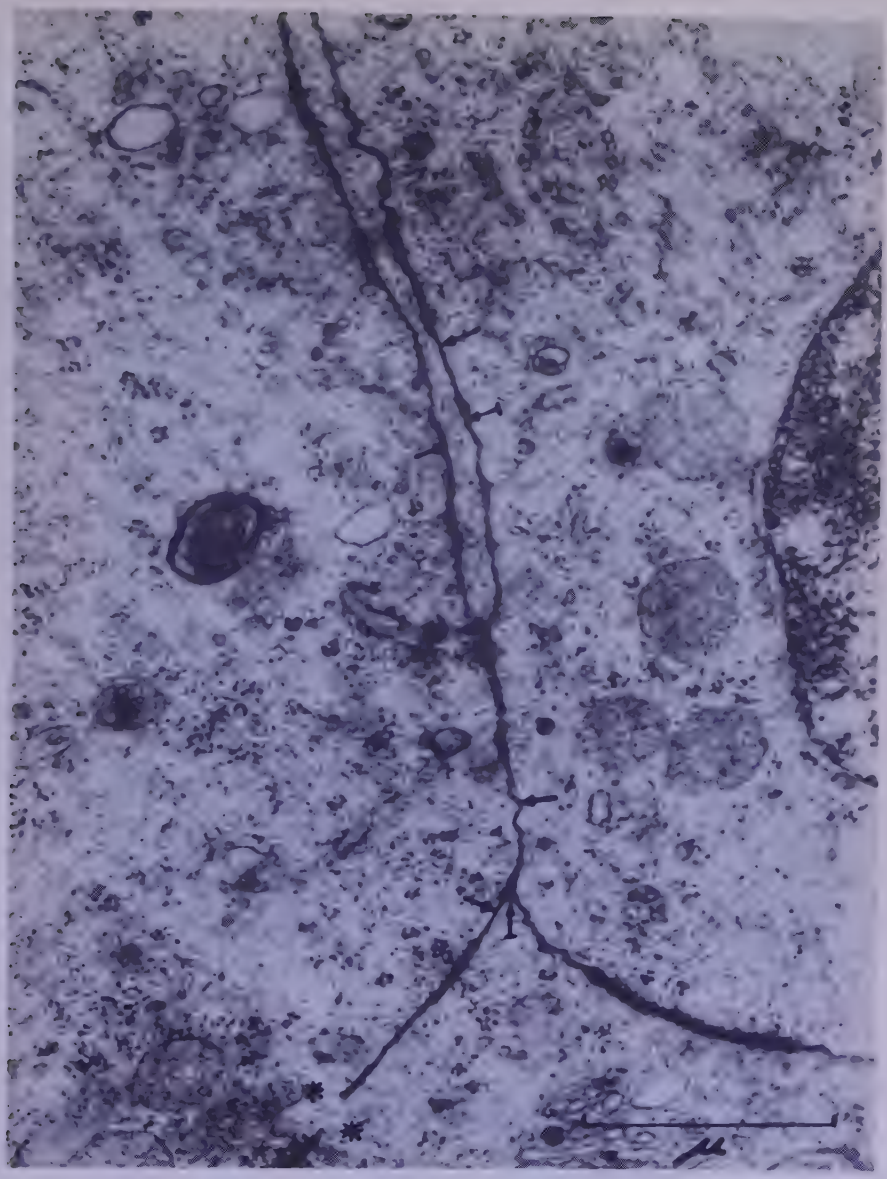


Abb. 11) Kultivationsdauer 24 Stunden
Zahlreiche 1oo A- Filamente (Pfeil) in einem Myoblastenfortsatz. Daneben zahlreiche freie Ribosomen (O), einzelne Mitochondrien (Mi) und Hohlräume des rauhen endoplasmatischen Retikulums (R).
Vergrößerung 1 : 6o ooo

Abb. 12) Kultivationsdauer 24 Stunden
Verzahnte Myoblastenfortsätze (F), in einem Fortsatz ein dichtgepacktes Filamentbündel (Pfeil) mit nur schlecht definierbarer Dicke.
Vergrößerung 1 : 61 2oo

Abb. 13) Kultivationsdauer 6 Tage
Längsschnitt durch eine Muskelfaser, möglicherweise ein Verschmelzungsvorgang mit einem Myoblasten erfaßt (Pfeil). In der Muskelfaser Myofilamentbündel (F) aus dicken und dünnen Filamenten, nur angedeutetes, unscharf begrenztes Z-Bandmaterial (*), in beiden Zellen zahlreiche Polysomengruppen (O), wie auch zahlreiche kleine Hohlräume des endoplasmatischen Retikulums (x). In der Muskelfaser eine typische Ribosomenspirale (Pfeil mit Querbalken), im Interzellularraum (I) zahlreiche kollagene Fibrillen (K)
FB = Fibroblastenfortsatz
Vergrößerung 1 : 6o ooo

K
FB
I
I
K
F
F

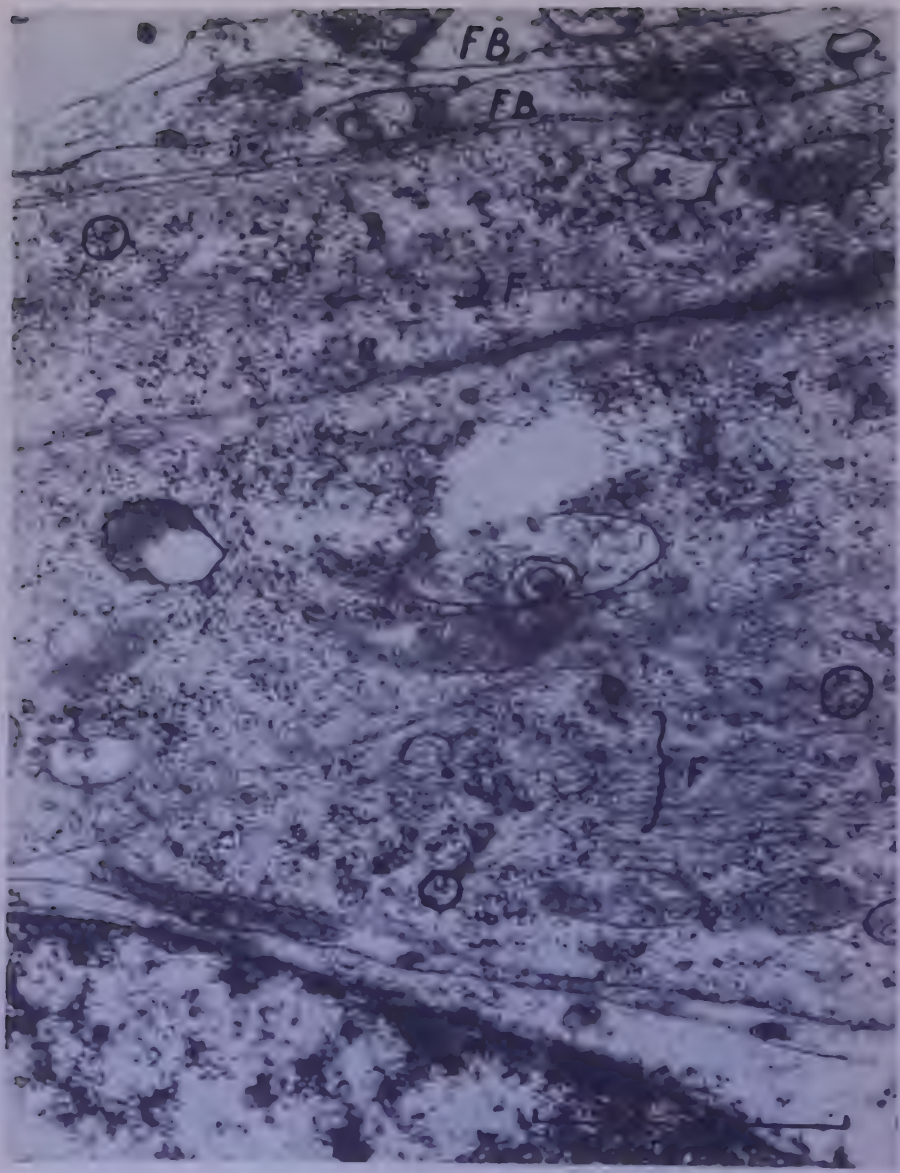


Abb. 14) wie Abb. 13
Vergrößerung 1 : 60 000

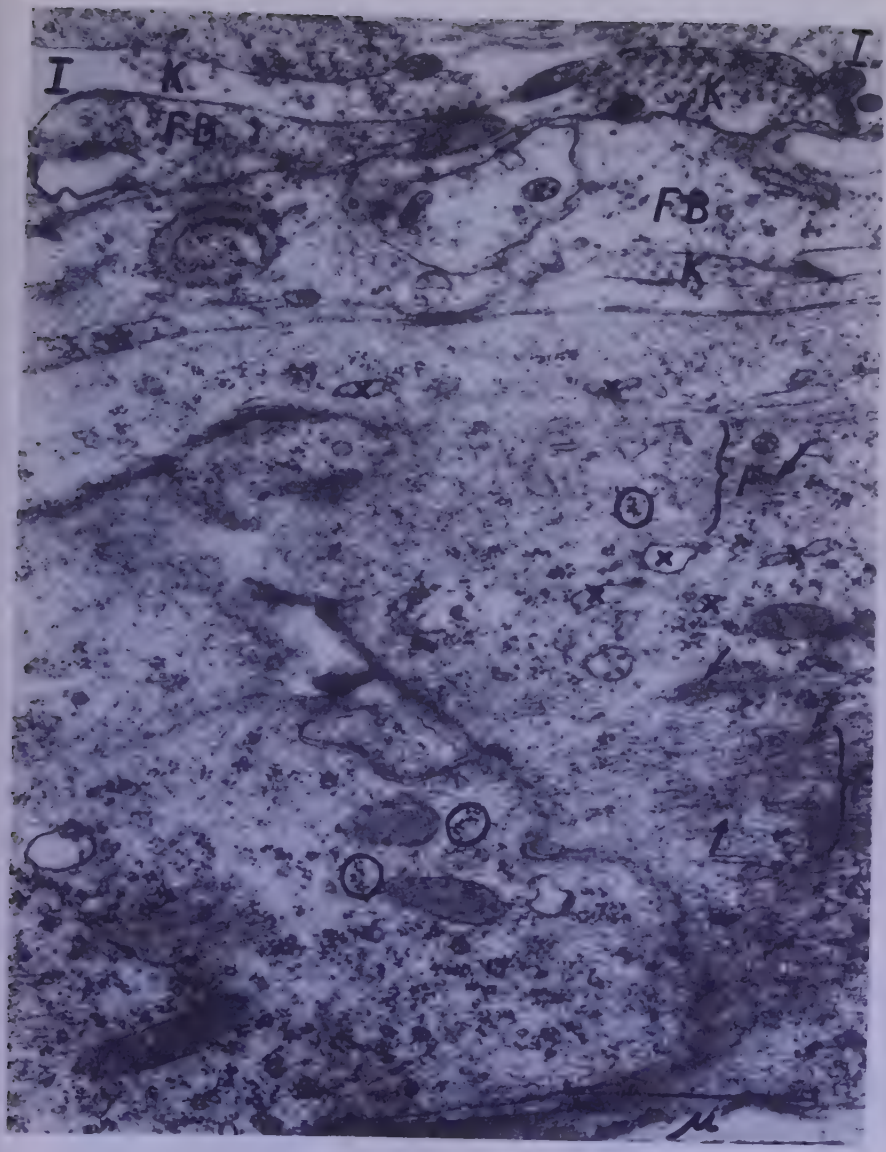


Abb. 15) wie Abb. 13
angedeutetes plaque- artiges Z- Bandmaterial (Pfeil)
Vergrößerung 1 : 50 000

Abb. 16) Kultivationsdauer 5 Tage
Querschnitt durch Muskelfasern mit zahlreichen Myofibrillen (MF_1, MF_2, Pfeile) oder nur peripher gelegene unscharf begrenzte Myofibrillen (MF_3). Daneben ein Myoblast (MB) und ein Fibro-Blast (FB). Im Interzellularraum (I) zahlreiche kollagene Fibrillen (K).
Vergrößerung 1 : 35 ooo

I
MF1
K
MF3
MB
MF2
FB
M

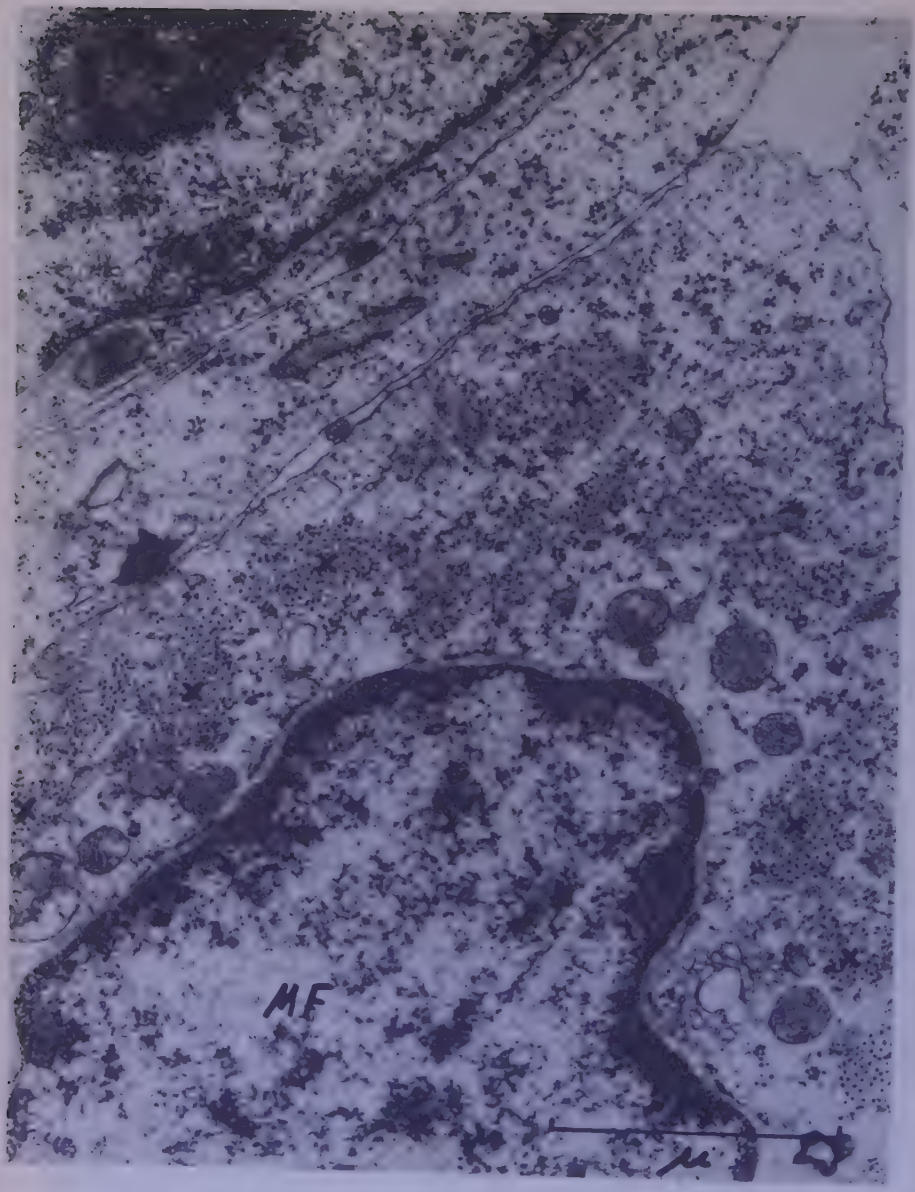


Abb. 17) Kultivationsdauer 6 Tage
Querschnitt durch eine Muskelfaser (MF) mit zahlreichen unscharf begrenzten Myofibrillen (x) aus dünnen und dicken Filamenten.
Vergrößerung 1 : 56 ooo

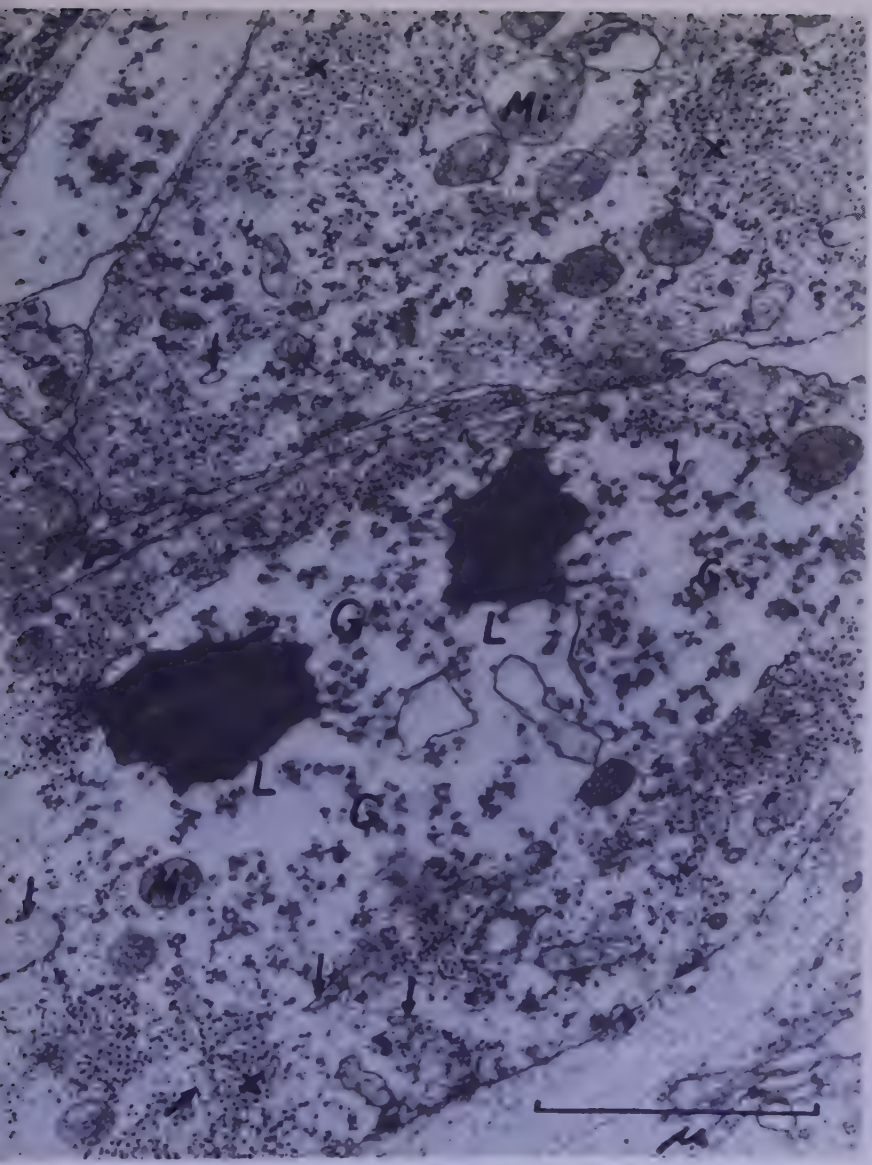


Abb. 18) Kultivationsdauer 5 Tage
Querschnitte durch Muskelfasern mit unscharf begrenzten Myofibrillen (x), Hohlräumen des endoplasmatischen Retikulums (Pfeil), Mitochondrien (Mi), Lipideinschlüssen (L) und Glykogengranula (G). Vergrößerung 1 : 56 000

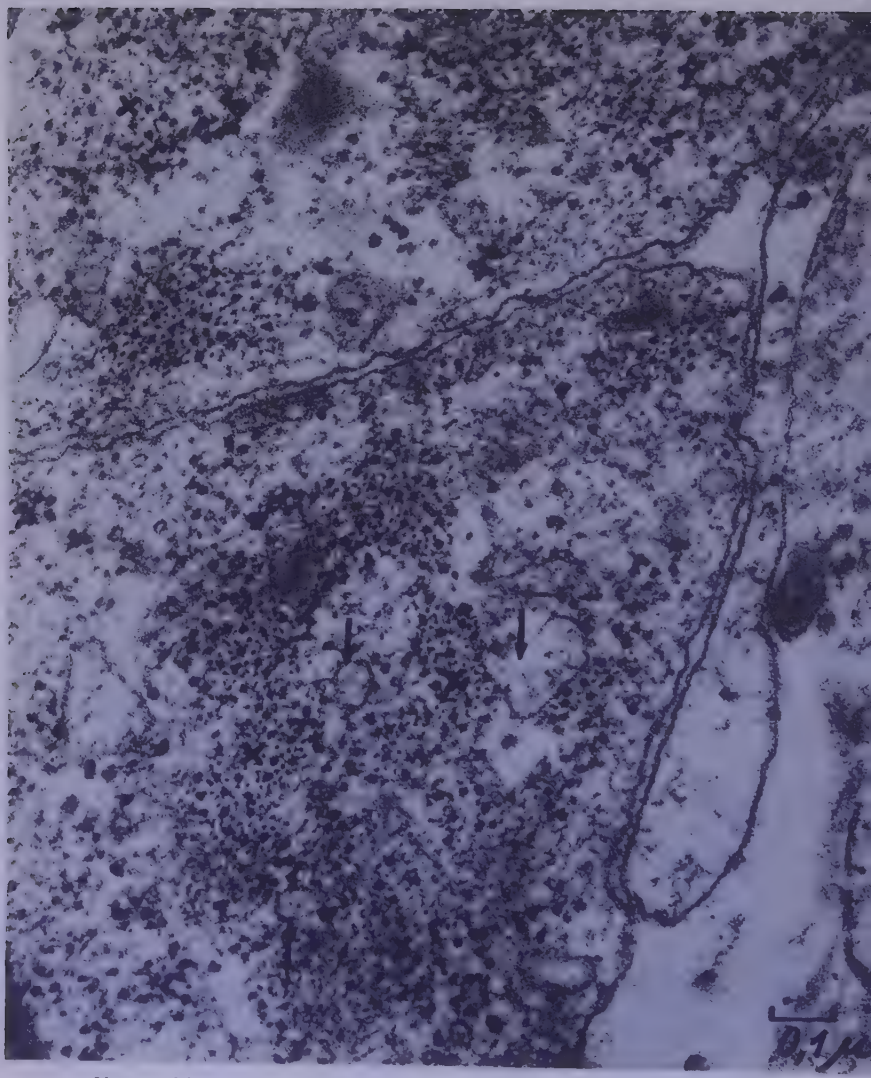


Abb. 19) Kultivationsdauer 6 Tage
Querschnitt durch zwei Myoblasten mit unscharf begrenzten Myofibrillen aus dicken und dünnen Filamenten und einzelnen Hohlräumen des endoplasmatischen Retikulum.
Vergrößerung 1 : 125 000

Literatur

Aydelotte M.B. : Influence of azetidine- 2- carboxylic acid on developing mouse limb cartilage in vitro.
Anat. Rec. 169 (1971) 269-27o

Aydelotte M.B., Kochhar D.M.: Development of mouse limb buds in organe culture: Chondrogenesis in the presence of prolin analog, L- acetidine- 2-carboxylic- acid.
Devel. Biol. 28 (1972) 191-2o1

Bischoff R., Holtzer H.: Mitosis and the processes of differentiation of myogenic cells in vitro.
J. Cell Biol. 41 (1969) 188-2oo

Breuer C.B., Davies M.C., Florini J.R.: Amino acid incorporation into cell- free preparations from skeletal muscle.
II. Preparations and properties of muscle ribosomes and polysomes.
Biochemistry 3 (1964) 1713-1719

Capers C.R.: Multinucleation of skeletal muscle in vitro.
J. biophys. biochem. Cytol. 7 (196o) 559-566

Church J.C.T.: Cell populations in skeletal muscle after regeneration.
J. Embryol. exp. Morph. 23 (197o) 531-537

Delain D., Meienhofer M.C., Proux D., Schapira F.: Studies on myogenesis in vitro: Changes of creatine kinase, phosphorylase and phosphofructokinase isozymes.
Differentiation 1 (1973) 349-354

Dubowitz V., Newman D.L.: Chance in enzyme pattern after cross innervation of fast and slow skeletal muscle.
Nature (London) 214 (1967) 84o-841

Ehrlich H.P., Ross R., Bornstein P.: Effects of antimikrotubular agents on the secretion of collagen.
J. Cell Biol. 62 (1974) 39o-4o5

Ellison M.L., Ambrose E.J., Easty G.C.: Myogenesis in chick embryo somites in vitro.
J. Embryol. exp. Morph. 21 (1969) 341-346

Enesco M., Puddy D.: Increase in the number of nuclei and weight in skeletal muscle of rats of various ages.
Amer. J. Anat. 114 (1964) 235-244

Ezerman E.B., Ishikawa H.: Differentiation of the sarcoplasmatic reticulum and T- system in developing chick skeletal muscle in vitro.
J. Cell Biol. 35 (1967) 4o5-42o

Faber J., de Both N.J.: The role of innervation in the manifestation of the digits in transplanted regeneration blastemas of axolotl.
Arch. Biol. 81 (197o) 215-227

Golisch G., Pette D., Pichlmaier H.: Metabolic differentiation of rabbit skeletal muscle as induced by specific innervation.
Eur. J. Biochem. 16 (197o) 11o-116

Gould R.P., Day A., Wolpert L.: Mesenchymal condensation and cell contact in early morphogenesis of the chick limb.
Exp. Cell Res. 72 (1972) 325-336

Hay E.D.: The fine structure of differentiating muscle in the salamander tail.
Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 59 (1963)6-34

Holtzer H., Marshall J., Finck H.: An analysis of myogenesis by the use of fluorescent antimyosin.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 3 (1957) 7o5-725

Huxley H.E.: Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle.
J. Mol. Biol. 7 (1963) 281-3o9

Ishikawa H.: In vitro formation of elaborate network of T- systems tubules in developing chick skeletal muscle.
J. Cell Biol. 35 (1967) 61

Ishikawa H.: Formation of elaborate networks of T-system tubules in cultured skeletal muskle with special reference to the T-system formation.
J. Cell Biol. 38 (1968) 51-66

Kelley R.O., Baker T.I., Crissman H.A.: Ultrastructure and growth of human limb mesenchyme (HLM 15) in vitro.
Anat. Rec. 175 (1972) 657-672

Kelly D.E.: Myofibrillogenesis and Z- band differentiation.
Anat. Rec. 1963 (1969) 4o3-426

von Keyserlingk D.: Kontraktilität und Ultrastruktur glycerinextrahierter Fibroblasten aus der Gewebekultur.
Protoplasma 67 (1969) 391-4o6

Kochhar D.: In: Symposion of metabolic pathways in mammalian embryos during organogenesis and its modification by drugs (eds. Bass, R., Beck, F., Merker, H.J., Neubert, D., Randhahn, B.)
Free University Berlin Press (1973)

Konigsberg et al.: The dissociability of desoxyribonucleic acid synthesis from the development of multinuclearity of muscle cells in culture.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 8 (196o) 333-43

Konigsberg I.R.: Colonal analysis of myogenesis.
Science (Washington) 14o (1963) 1273

Lipton B.H., Konigsberg I.R.: A fine- structural analysis of the fusion of myogenic cells.
J. Cell Biol. 53 (1972) 348-364

Mauro A.: Satellite cells of skeletal muscle fibers.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 9 (1961) 493-95

Merker H.J.: Entstehung und Reifung des Bindegewebes und die pharmakologische Beeinflussung dieser Vorgänge. In: Byk Gulden "Neue Gesichtspunkte zu den Folgen der chronischen Polyarthritis - ihre Feststellung und Behandlung". Byk Gulden Pharmazeutika, Medizinisch- Wissenschaftliche Abteilung, Konstanz 1974

Merker H.J., Zimmermann B., Neubert D.: Morphologie von Mäuseextremitätenknospen in einem Organkultursystem.
In Vorbereitung für Z. Anat.- Entwicklungsgesch. (1975 a)

Merker H.J., Zimmermann B., Neubert D.: Morphological studies on the development of mouse limb buds in organ culture.
Teratology 1o (1975 b) 317 (A)

Merchant D.J., Kahn R.H., Murphy W.H.: Handbook of cell and organ culture. The University of Michigan, Medical School.
Burgess Publishing Company, 196o

Morton D.J., Rowe R.W.D.: Development of ovine skeletal muscle: The occurence of a sarcolemmal process on fetal myotubes.
J. Ultrastruct. Res. 47 (1974) 142-152

Muscatello U., Margreth A., Aloisi M.:On the differential response of sarcoplasm and myoplasm to denervation in frog muscle.
J. Cell Biol. 27 (1965) 1-24

Neubert D., Merker H.J., Tapken S.: Comparative studies on the prenatal development of mouse extremities in vivo and in organ culture.
Naunyn- Schmiedebergs Arch. (1975 a) in Druck

Neubert D., Tapken S., Merker H.J.: Induction of skeletal malformations in organ cultures of mammalian embryonic tissue.
Naunyn- Schmiedebergs Arch. (1975 b) in Druck

O'Neill M.C., Stockdale F.E.: A kinetic analysis of myogenesis in vitro.
J. Cell Biol. 52 (1972) 52-65

Okazaki K., Holtzer H.: An analysis of myogenesis in vitro using fluoresceinlabeled antimyosin.
J. Histichem. Cytochem. 13 (1965) 726-739

Porter K.R.: Cytoplasmatic microtubules and their functions. In: Principles of Biomolecular Organisation (eds. Wolstenholme G.E., O'Connor M.)
Little, Brown and Co. Inc., Boston, 1966

Powell J.A.: Development of normal and genetically dystrophic mouse muscle in tissue culture.
Exp. Cell Res. 8o (1973) 251-264

Prewitt M.A., Salafsky B.: Enzymic and histochemical changes in fast and slow muscles after cross innervation.
Amer. J. Physiol. 218 (197o) 69-74

Püschmann H.: Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen zur embryonalen Gelenksentwicklung bei der Maus in vivo wie in vitro. (unveröffentlicht)

Purdy J.E., Lieberman M., Roggeveen A.E., Kirk R.G.: Synthetic strands of cardiac muscle.
J.Cell Biol. 55 (1972) 563-578

Reznik M.: Origin of myoblasts during skeletal muscle regeneration. Electron microscopic observation.
Lab. Invest. 2o (1969) 353-363

Romanul F.C.A., van der Meulen J.P.: Reversal of the enzyme profiles of muscle fibers in fast and slow muscles by cross innervation.
Nature (London) 212 (1966) 1369-137o

Schiaffino S., Settembrini P.: Studies on the effect of denervation in developing muscle.
Virchows Arch. Abt. B. Zellpathol. 4 (197o) 345-356

Schüssler R.: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Muskelentwicklung in der hinteren Extremität von Hühnerembryonen.
Inaugural- Dissertation zu Erlangung der med. Doktorwürde an den Mediz. Fachbereichen der Freien Universität Berlin, II. Anat. Inst., 1971

Schüssler R.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Myogenese in der unteren Extremität von Hühnern.
Acta anat. 88 (1974) 321-347

Shimada Y.: Myogenesis: Fusion, myosin synthesis and the mitotic cycle.
Proc. Nath. Acad. Sci. U.S. 56 (1966) 1484

Shimada Y.: Electron microscope observations on the fusion of chick myoblasts in vitro.
J Cell Biol. 48 (1971) 128-142

Shimada Y., Fischmann D.A., Moscona A.A.: The fine structure of embryonic chick sceletal muscle cells differentiated in vitro.
J. Cell Biol. 35 (1967) 445-453

Summerbell D., Lewis J.H., Wolpert L.: Positional information in chick limb morphogenesis.
Nature (London) 244 (1973) 492-496

Trowell O.A.: The culture of mature organs in a synthetic medium.
Exp. Cell Res. 16 (1959) 118-147

Weissenfels N.: Der Einfluß der Gewebezüchtung auf die Morphologie der Hühnerherzmyoblasten.
Protoplasma, Sonderabdrücke aus Bd. LIV (1961) Heft 2, (1962) Heft 3 und 4

Wittig M.: Die Morphogenese der lumbalen Hypaxialmuskulatur des Hauskaninchens.
Z. f. mikr.- anat. Forschung 79 (1968) 27-81

Zimmermann B., Neubert D., Bachmann D., Merker H.J.: Induction of skeletal malformations in organ cultures of mouse limb buds.
Experientia (1975) (in press)

Für die Überlassung des Themas:

MYOGENESE IN EINEM ORGANKULTURSYSTEM VON EXTREMITÄTEN-KNOSPEN 11 TAGE ALTER MÄUSEEMBRYONEN

danke ich Herrn Prof. Dr. med. H.- J. Merker.

Lebenslauf

Am 16. März 1948 wurde ich als Sohn des Kürschnermeisters Theodor Baumgarten und seiner Frau Maria, geb. Althaus, in Stassfurt geboren.

Nach achtjähriger Grundschulzeit besuchte ich die erweiterte Oberschule in Stassfurt, wo ich 1966 die Reifeprüfung ablegte. Gleichzeitig mit dem Abitur schloß ich eine Facharbeiterlehre als Elektromonteur im VEB Kaliwerk Stassfurt ab.

Im Sommer 1967 nahm ich, nach Ableistung eines praktischen Jahres im Kreiskrankenhaus Stassfurt, das Studium der Medizin an der Matin- Luther- Universität zu Halle- Wittenberg auf. Dort bestand ich 197o das Physikum und bis zum Frühjahr 1973 den größten Teil des Staatsexamens während der klinischen Ausbildung.

Nach der Übersiedelung in die Bundesrepublik im April 1973 und der Anerkennung meines bisherigen Studiums, beendete ich an der FU Berlin das Staatsexamen im Sommer 1974 mit der Note "gut".
Seit dem 1. 1o. 1974 bin ich als Medizinalassistent am II. Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin tätig.